



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES MICROBICIDAS DE
NANOPARTÍCULAS DE NiO, Fe₂O₃, Y NiFe₂O₄.**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. KAREN LORAINÉ RINCÓN GRANADOS

DRA. AMÉRICA ROSALBA VÁZQUEZ OLMOS
INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA, ICAT

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO DEL 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES MICROBICIDAS DE
NANOPARTÍCULAS DE NiO, Fe₂O₃, Y NiFe₂O₄.**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**


MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q. KAREN LORAIN RINCÓN GRANADOS



Ciudad de México, Agosto del 2020



“No soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico, también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas”.

Marie Curie

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Dr. José Manuel Saniger Blesa**

PRIMER VOCAL: **Dra. María del Pilar Carreón Castro**

SEGUNDO VOCAL: **Dra. Margarita Rivera Hernández**

TERCER VOCAL: **Dra. Ana Leticia Fernández Osorio**

SECRETARIO: **Dr. Jesús Gracia Mora**

SITIOS DONDE SE DESARROLLARON LAS DIFERENTES ETAPAS DEL TEMA:

✚ Grupo Académico de Sistemas Híbridos y Nanoespectroscopia, ICAT, UNAM.

✚ Laboratorio de Genética Molecular, División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM.

EVENTOS EN LOS CUALES SE PRESENTARON LOS RESULTADOS DERIVADOS DE ESTE TRABAJO:

✚ **Rincón Granados, Karen**; Vázquez Olmos, América; Fernández Osorio, Ana Leticia; Sato Berrú, Roberto. Obtención de nanopartículas de óxido de Níquel (NiO), Hematita (Fe_2O_3) y Ferrita de Níquel (NiFe_2O_4) a partir de un método mecanoquímico. IX Encuentro de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Orizaba, Veracruz, 25- 28 de junio de 2019.

✚ **Karen Loraine Rincón Granados**; América Vázquez Olmos; Fabián Ruíz Ruíz; Roberto Sato Berrú; Vicente Garibay Febles; Alejandro Vega Jiménez; Margarita Linares Zapien. Spectroscopic and structural study of nickel oxide (NiO) and nickel ferrite (NiFe_2O_4) nanoparticles. Simposio Internacional, "Química y Materiales en el Siglo XXI" (Future of Science 2019). Instituto de Química, UNAM. Ciudad de México, 7 y 8 de octubre de 2019.



DEDICATORIA

A mi mamá, quien ha sido el motor de mi vida y ha hecho todo lo posible e imposible para que yo haga realidad mis sueños, gracias por su absoluto amor y apoyo incondicional, por brindarme las palabras cálidas en los momentos difíciles, por confiar y creer en mí siempre.

A mi abuela materna, quien ha sido otra mamá a lo largo de mi vida, quien siempre ha confiado ciegamente en mí, quien me motiva a seguir cuando desfallezco, e imparte palabras de aliento cuando mi corazón esta débil, gracias por siempre recordarme que los esfuerzos valen la pena.

A toda mi familia, por acompañarme y apoyarme siempre, porque incluso por encima de la distancia sus consentimientos llenos de amor han alegrado mi corazón cuando más lo he necesitado.



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, con mi número de CVU 918234, el cual financió mi estancia en México. A México por abrirme sus puertas a esta hermosa cultura y su linda gente, a este bello país gracias por acogerme.

Al proyecto PAPIIT IN108696 por el financiamiento aportado para la realización de esta investigación.

A la Dra. América Vázquez Olmos, por contribuir en mi formación profesional, por sus aportes, ideas, tiempo y dedicación que me brindó a lo largo de mi tesis, por darme la oportunidad de desarrollar una tesis acompañada de tan valioso talento.

Al laboratorio de genética molecular del posgrado de odontología y a los investigadores Dra. Patricia Rodríguez y al Dr. Alejandro Vega por el apoyo, tiempo, y el espacio de sus instalaciones para llevar a cabo las pruebas microbicidas.

Al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, ICAT, al laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica, LUCE, y a la Dra. Selene Rubí Islas Sánchez por su acompañamiento y asesoría en las técnicas de caracterización.

A mis evaluadores: Dr. José Manuel Saniger Blesa, Dra. María del Pilar Carreón Castro, Dra. Margarita Rivera Hernández, Dra. Ana Leticia Fernández Osorio y Dr. Jesús Gracia Mora, por su valiosa atención y tiempo en aportaciones a mi trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, por darme la oportunidad de ser parte de esta gran casa de estudios, a todos sus talentosos investigadores y personal no docente que de una u otra forma contribuyeron para todo mi proceso de formación.

¡Mil Gracias!

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	13
2.1 Óxido de níquel, NiO	13
2.2 Óxido de hierro (III), α -Fe ₂ O ₃ (hematita).....	16
2.3 Ferrita de Níquel, NiFe ₂ O ₄	19
2.4 Método Mecanoquímico	21
2.5 Bacterias Gram negativas y Gram positivas	23
2.6 Bacterias multirresistentes	25
2.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.6.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
2.7 Mecanismos propuestos para el efecto de las NPs sobre las bacterias .	28
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
4. JUSTIFICACIÓN.....	34
5. HIPÓTESIS.....	35
6. OBJETIVOS.....	35
7. PARTE EXPERIMENTAL	36
8. RESULTADOS Y DISCUSION	46
9. CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXOS	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura cristalina del NiO.	14
Figura 2. Estructura cristalina de la hematita (α -Fe ₂ O ₃).....	16
Figura 3. Estructura cristalina de la ferrita de níquel, NiFe ₂ O ₄	19
Figura 4. Esquema general de las etapas en un proceso de mecosíntesis.....	22
Figura 5. Estructura del Peptidoglicano.....	24
Figura 6. Esquema comparativo de las paredes celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas, y la respectiva tinción de Gram que ocasionan.	25
Figura 7. Imagen de microscopia electrónica de barrido (SEM) coloreada digitalmente en donde se muestran bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> de color mostaza y esferoides que estaban en proceso de escapar de su destrucción por los glóbulos blancos humanos de color azul. Ampliación - 20,000x [38].	27
Figura 8. Imagen SEM de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Biblioteca de imágenes de salud pública (PHIL), número de identificación # 10043 [40].	28
Figura 9. Mecanismos posibles del efecto bactericida de los óxidos metálicos nanoestructurados.....	32
Figura 10. Esquema general de la síntesis de las NPs de NiO.	38
Figura 11. Proceso de obtención de las NPs de: a) NiO, b) Fe ₂ O ₃ y c) NiFe ₂ O ₄ . I. Activación de la sal metálica correspondiente, II. Molienda de la sal metálica en presencia de NaOH, III. Fin de la molienda, cuando no se observan cambios y IV. Producto obtenido después de los lavados y del tratamiento térmico.....	39
Figura 12. <i>Ensayo 1</i>). Susceptibilidad bacteriana en caldo TSB. Esquema general de la posición de los sistemas de NPs, CP+, CN-, y caldo TSB, en los pozos de las placas. Se repite la misma distribución de las placas 1-3 correspondientes para los ensayos con cada cepa bacteriana y el control de densidades ópticas de NPs.	43
Figura 13. <i>Ensayo 2</i>). Susceptibilidad bacteriana en TSA. Esquema general de la posición de las respectivas dispersiones de 5 a 0,625 mg/mL, para cada uno los sistemas de NPs, y la dilución bacteriana respectiva, en los pozos de las placas en TSA. Se realizó el mismo tipo de distribución en placa para cada uno de los sistemas de NPs, y para cada bacteriana bajo estudio.	44

Figura 14. <i>Ensayo 3</i>). Susceptibilidad bacteriana en agar TSA con NPs como suplemento. Esquema general de la posición de las respectivas dispersiones de 5 a 1 mg/mL por triplicado, para cada uno de sistemas de NPs, el CP+, CN-, y TSA, en los pozos de las placas en agar (por cada sistema de NPs se emplearon 2 placas de 12 pozos). Se realizó el mismo tipo de distribución de la placa para cada uno de los sistemas de NPs, y para cada bacteria bajo estudio.	45
Figura 15. Difractograma de las NPs de NiO.....	46
Figura 16. Espectro Raman de las NPs de NiO	48
Figura 17. Espectro FTIR de las NPs de NiO	49
Figura 18. Espectro de absorción electrónica UV-Vis de las NPs de NiO.	50
Figura 19. Gráfica de <i>Tauc</i> para el cálculo del valor de la energía de brecha prohibida para las NPs de NiO.....	51
Figura 20. Micrografías de TEM de las NPs de NiO a diferentes aumentos, distancias interplanares, histograma de tamaños de NPs, y su respectiva transformada de Fourier inversa.	53
Figura 21. Curva de Magnetización de las NPs de NiO.	54
Figura 22. Difractograma de las NPs de Fe ₂ O ₃	55
Figura 23. Espectro Raman de las NPs de Fe ₂ O ₃	57
Figura 24. Espectro FTIR de las NPs de Fe ₂ O ₃	58
Figura 25. Espectro de absorción electrónica UV-Vis de las NPs de Fe ₂ O ₃	58
Figura 26. Gráfico de <i>Tauc</i> para el cálculo del valor de la energía de brecha prohibida de las NPs de Fe ₂ O ₃	59
Figura 27. Micrografías TEM de las NPs de Fe ₂ O ₃ a diferentes aumentos, sus tamaños de nanopartícula, distancias interplanares, y su respectiva transformada de Fourier inversa.	60
Figura 28. Curva de Magnetización de las NPs de Fe ₂ O ₃	61
Figura 29. Difractograma de las NPs de NiFe ₂ O ₄	62
Figura 30. Espectro Raman para las NPs de NiFe ₂ O ₄	64
Figura 31. Espectro FTIR para las NPs de NiFe ₂ O ₄	65
Figura 32. Espectro de absorción UV-Vis de las NPs de NiFe ₂ O ₄	66




Figura 33. Gráfico de $Tauc$ para el cálculo del valor de la energía de brecha prohibida de las NPs de $NiFe_2O_4$	67
Figura 34. Micrografías TEM de las NPs de $NiFe_2O_4$ a diferentes aumentos, distancias interplanares, histograma de tamaños de NPs, y su respectiva transformada de Fourier inversa.	68
Figura 35. Curva de Magnetización de las NPs de $NiFe_2O_4$	69
Figura 36. Gráfica de absorbancia vs concentración, obtenida de las placas de 96 pozos en TSB a una $\lambda= 595$ nm, para <i>P. aeruginosa</i>	71
Figura 37. Gráfica de absorbancia vs concentración, obtenida de las placas de 96 pozos en TSB a una $\lambda= 595$ nm, para <i>S. aureus</i>	72
Figura 38. Fotografía de las placas de 12 pozos en TSA después de 3 días de interacción para: a.) <i>P. aeruginosa</i> , y b.) <i>S. aureus</i> . Los pozos se presentan en la misma disposición que se distribuyeron en la Figura 13.	75
Figura 39. Fotografía de las placas de 12 pozos en TSA con suplemento de NPs, tomadas después de 3 días de la interacción NPs- <i>S. aureus</i> . Los pozos se presentan en la misma disposición que se distribuyeron en la Figura 14.	79



Abreviaturas y Anglicismos

NPs Nanopartículas

nm Nanómetros

FTIR Espectroscopia* Infrarroja con Transformada de Fourier

UV Ultravioleta

IUPAC Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (por sus siglas en inglés)

OMS Organización Mundial de la Salud

µm Micrómetros

MRSA *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (por sus siglas en inglés)

ICDD Centro Internacional de datos para difracción (por sus siglas en inglés)

DRX Difracción de rayos X

HR-TEM Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (por sus siglas en inglés)

UFC's Unidades formadoras de colonia

ADN ácido desoxirribonucleico

FDA Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América

ATP Adenosín trifosfato

LPS lipopolisacáridos

TSA Agar de soya tripticaseína

TSB Caldo de soya tripticaseína

*Según la real academia española (RAE), las palabras espectroscopia y espectroscopía, son válidas y se refieren a lo mismo.

1. INTRODUCCIÓN

En este trabajo de investigación se presenta la obtención, caracterización y evaluación de las propiedades microbicidas de nanopartículas (NPs) de óxido de níquel (NiO), hematita (α -Fe₂O₃), y ferrita de níquel (NiFe₂O₄) con diámetro promedio de cristalito de 7±1 nm, 22±10 nm y 5±1 nm, respectivamente, obtenidas mediante activación mecánica. Las NPs de NiO, Fe₂O₃, y NiFe₂O₄ obtenidas fueron caracterizadas por difracción de rayos-X en polvo (DRX), espectroscopia Raman, espectroscopia FTIR, espectroscopia de absorción electrónica en la región del UV-Visible, microscopía electrónica de transmisión (TEM), y se estudió su comportamiento magnético a temperatura ambiente.

La actividad microbicida de las NPs obtenidas, se probó en dos cepas bacterianas; una gram positiva, *Staphylococcus aureus*, y una gram negativa, *Pseudomonas aeruginosa*. Dicha actividad se evaluó mediante ensayos de susceptibilidad bacteriana con dispersión de NPs en caldo de soya tripticaseína (TSB), susceptibilidad bacteriana con dispersión de NPs en agar de soya tripticaseína (TSA), y susceptibilidad bacteriana en TSA con suplemento de NPs. La actividad microbicida se determinó a partir de la absorción bacteriana y del conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC's).

Esta tesis consta de 4 secciones principales: En la 1° sección se presentan, los antecedentes bibliográficos relacionados con los materiales nanoestructurados objeto de estudio de este trabajo. La 2° sección aborda la metodología de la síntesis empleada para la obtención de las NPs, así como las técnicas y los equipos empleados en su caracterización, y la evaluación de sus propiedades microbicidas. En la 3° sección se presentan los resultados obtenidos, y la discusión de los mismos. Por último, en la 4° sección se presentan las conclusiones del trabajo.



2. ANTECEDENTES

Las nanopartículas de óxidos metálicos se han convertido en materiales muy atractivos debido a las propiedades únicas que exhiben, tanto electrónicas como magnéticas. Actualmente, estos óxidos nanoestructurados presentan una amplia gama de aplicaciones en materiales conductores, superconductores, semiconductores, catalíticos, emisores de luz, dieléctricos, magnéticos, etc. Así como en aplicaciones biológicas. Debido a sus dimensiones nanométricas y a su gran área superficial específica, estos materiales resultan candidatos idóneos para interactuar con las bacterias. De tal manera que las NPs de óxidos metálicos se han convertido en una alternativa promisoría para combatir bacterias, en especial aquellas resistentes a la acción de antibióticos [1]. Dentro de los materiales explorados se ha informado que los óxidos metálicos como el óxido de titanio (TiO_2), óxido de zinc (ZnO), óxido cúprico (CuO), magnetita (Fe_3O_4), y el óxido de magnesio (MgO), presentan importantes propiedades antimicrobianas. Así mismo, los óxidos tipo espinela MFe_2O_4 (donde, $\text{M(II)} = \text{Co, Mn, ó Ni}$), emergen como materiales prometedores, particularmente para aplicaciones biológicas, las cuales dependen en gran medida de su composición química, morfología y tamaño [2]. En este trabajo de tesis se obtuvieron NPs de NiO , Fe_2O_3 y de NiFe_2O_4 por un método mecanoquímico, para posteriormente evaluar sus propiedades microbicidas.

2.1 Óxido de níquel, NiO .

En la naturaleza el óxido de níquel es poco común y se encuentra como el mineral bunsenita. El NiO cristaliza en una estructura cúbica centrada en las caras, donde cada catión Ni^{2+} se encuentra rodeado de seis aniones O^{2-} , y viceversa, como se muestra en la Figura 1. Por otro lado, el NiO es un semiconductor transparente tipo p con un valor de energía de brecha prohibida en el intervalo de 3.2–4.0 eV [3].

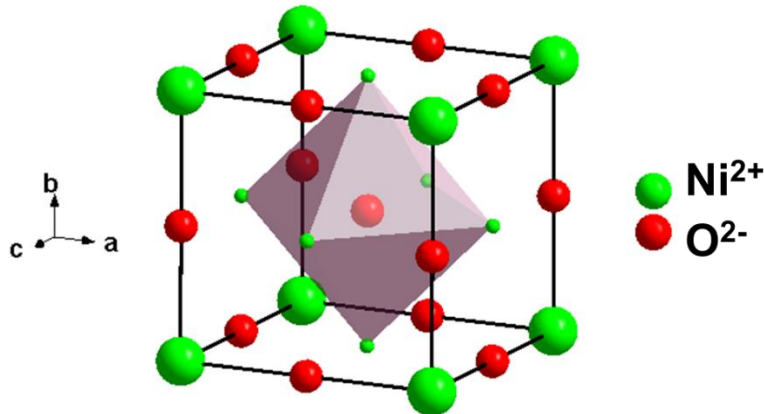
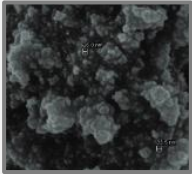
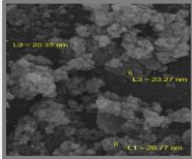
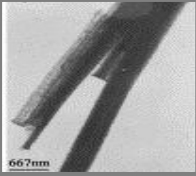
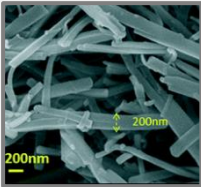
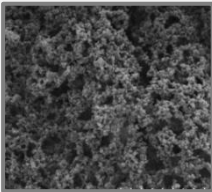
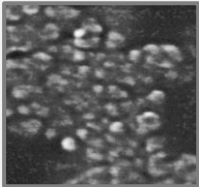


Figura 1. Estructura cristalina del NiO.

El NiO se ha investigado ampliamente como catalizador, material de electrodos para baterías de iones de litio y pilas de combustible, en películas electrocrómicas, supercondensadores electroquímicos, material magnético y como sensor de gases [4-6]. El NiO también se usa para la separación de proteínas reciclables, y como biosensor. Además, el NiO se ha empleado como agente microbicida debido a sus propiedades antibacterianas [7]. En este sentido, Soumyadipta Rakshit y *et al.* evaluaron las propiedades antimicrobianas de NPs de NiO sintetizadas por Bio-gel (de 20-30 nm) obteniendo una concentración mínima inhibitoria de 8 $\mu\text{g/mL}$. Además, una concentración mínima bactericida de 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$, y una zona de inhibición, por antibiograma de 18 y 21 mm, para *P. aeruginosa* y *B. subtilis*, respectivamente, concluyendo que las bacterias tratadas con NPs de NiO indicaron acción antimicrobiana, mediante la disrupción de la membrana y la lisis celular. Así mismo, su baja actividad hemolítica a bajas concentraciones, hace aún más útiles a estas NPs para aplicaciones biomédicas [7].

La obtención de NPs de NiO se ha llevado a cabo empleando diferentes métodos: sol-gel, microemulsión, co-precipitación, solvotermal, ablación térmica, descomposición térmica y pirólisis [13]. En la Tabla 1, se resumen algunos de los métodos de síntesis para la obtención de NPs de NiO, condiciones experimentales, así como las formas y tamaños de dichas nanoestructuras.

Tabla 1. Principales métodos empleados para la síntesis de nanoestructuras de NiO.

Método de Síntesis	Detalles experimentales	Tamaño y morfología	Ref.
Sol-gel	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O; Polientilenglicol; Tritón X-100; 80-200°C	33 nm 	[8]
Co-precipitación	NiCl ₂ ·6H ₂ O; NaOH; 500°C	24 nm 	[9]
Descomposición térmica	NiSO ₄ ·6H ₂ O; Dimetilglioxima en etanol; 400°C	18 nm 	[10]
Hidrotermal	NiCl ₂ ·6H ₂ O; C ₄ O ₆ H ₄ KNa; Autoclave 200°C-450°C	200 nm 	[11]
Tratamiento térmico	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O; 500-800°C	14-34 nm 	[12]
Ablación Láser	En 3% H ₂ O ₂	8 nm 	[13]

2.2 Óxido de hierro (III), α -Fe₂O₃ (hematita).

El óxido de hierro (III), se presenta en la naturaleza como el mineral hematita, con fórmula mínima Fe₂O₃. La hematita cristaliza en el sistema trigonal, clase hexagonal escalenoédrica, (Ver Figura 2). Es polimorfo de la luogufengita y de la maghemita (γ -Fe₂O₃). Es un óxido paramagnético y aislante eléctrico [14].

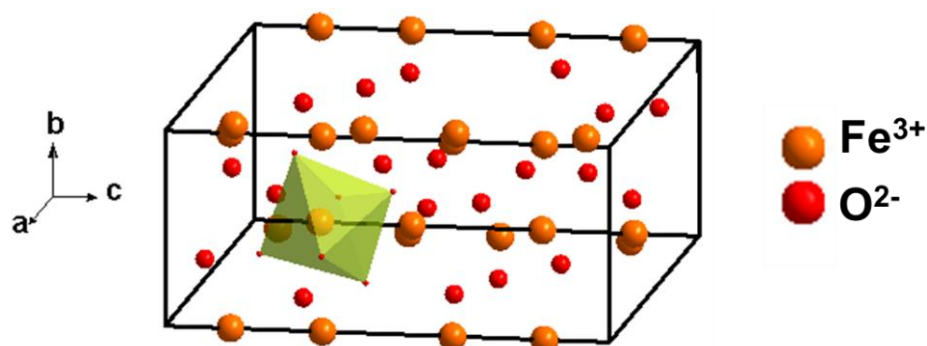



Figura 2. Estructura cristalina de la hematita (α -Fe₂O₃).

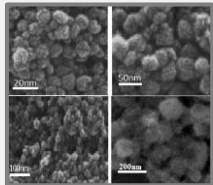
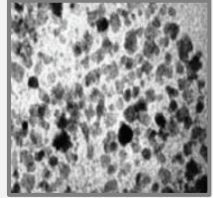
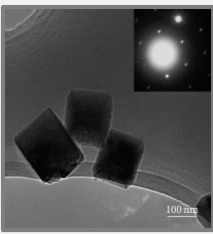
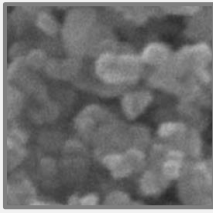
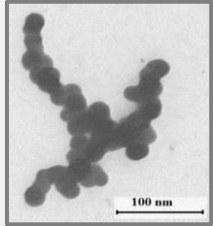
En general los óxidos y oxohidroxos de hierro son de gran importancia en aplicaciones tecnológicas e industriales. En particular la hematita exhibe una alta resistencia a la corrosión, por lo tanto, se ha utilizado extensivamente en muchos campos que incluyen la electrólisis fotoasistida de agua, debido a su energía de brecha prohibida entre 2.0–2.2 eV, la estabilidad química en medio acuoso, y su baja toxicidad. Además, es un componente activo de sensores de gas, catalizadores, baterías de iones de litio, pigmentos y oxidante en la composición de termita. También se usa en ferrofluidos, para la amortiguación en motores inerciales, amortiguadores, fluidos de transferencia de calor, etc, [15]. Debido a sus múltiples aplicaciones, la hematita nanoestructurada recientemente ha despertado interés científico como agente antibacteriano, después de que la FDA la aprobó para aplicaciones alimentarias y médicas [16-19]. Además, los nanocristales de hematita son muy estables químicamente en un rango de pH variable, son biocompatibles, y de bajo costo de fabricación [20]. En este sentido, Azam, A. y *et al.* evaluaron la actividad antimicrobiana de NPs de α -Fe₂O₃ (de 35.16 ± 1.47 nm) sintetizadas por el método sol-gel combustión, en las cepas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* y *S.*



aureus. La actividad antibacteriana se realizó mediante el método de difusión de disco, en un antibiograma, observando los diferentes niveles de zona de inhibición. Encontraron una zona de inhibición de 15 mm para el sistema α -Fe₂O₃ y una concentración mínima bactericida de 65, 120, 80, y 78 μ g/mL para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* y *S. aureus*, respectivamente. Los autores concluyeron que el sistema presenta actividad microbicida que podría darse por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la acumulación de NPs. Sin embargo, la actividad microbicida de las NPs de hematita fue menos efectiva comparada con otros sistemas estudiados en esa investigación; NPs de ZnO y de CuO [21].

Por lo tanto, para los usos actuales de los óxidos de hierro en nanobiomedicina, se requieren principalmente que las nanopartículas puedan obtener ciertas características, que pueden lograrse controlando su síntesis. Diferentes técnicas se han utilizado para fabricar nanomateriales de hematita para diversas aplicaciones. La síntesis húmeda incluye métodos como: termólisis, hidrólisis forzada, precipitación/coprecipitación, que en el caso de la hematita podría implicar la síntesis de un producto intermedio (ferrihidrita, goetita o ambos), seguido de la deshidroxilación a alta temperatura, o la síntesis Sol-gel. Donde esta última, implica la disolución del Fe³⁺ y un compuesto orgánico para formar el sol, concentrando el sol mediante la eliminación del agua para formar el gel y el tratamiento térmico posterior para obtener el producto requerido. También síntesis hidro/solvotérmica, en la que se precipita α -Fe₂O₃ a alta temperatura (que varía de 160°C a 280 °C) [15]. Algunos de los principales métodos que se han empleado para la obtención de hematita se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales métodos empleados en la síntesis de nanoestructuras de α - Fe_2O_3 .

Método de Síntesis	Detalles experimentales	Tamaño y morfología	Ref.
Ruta Verde	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Extracto de Hojas de <i>Ailanthus excelsa</i>	40 nm 	[22]
Sol-gel, Combustión	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$; Ácido cítrico; 200 y 400°C	35.16 ± 1.47 nm 	[21]
Hidrotermal	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; Trietilamina; Autoclave 160°C por 1-24 h.	100-200 nm 	[23]
Activación mecánica	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; KCl; KOH; 600-800°C	85 nm 	[24]
Electroquímico	Electrodo de Fe y Pt; Sales cuaternarias de amonio; 400-800°C	6.0-14.9 nm 	[25]

2.3 Ferrita de Níquel, NiFe₂O₄.

La ferrita de níquel, NiFe₂O₄ es un material cerámico, que cristaliza en un sistema cúbico tipo espinela inversa, es decir los iones Ni²⁺ (3d⁸) ocupan 8 posiciones octaédricas y los 16 iones Fe³⁺ (3d⁵), se dividen de tal forma que 8 se ubican en sitios octaédricos (O_h) y 8 llenan posiciones tetraédricas (T_d), (Ver Figura 3).

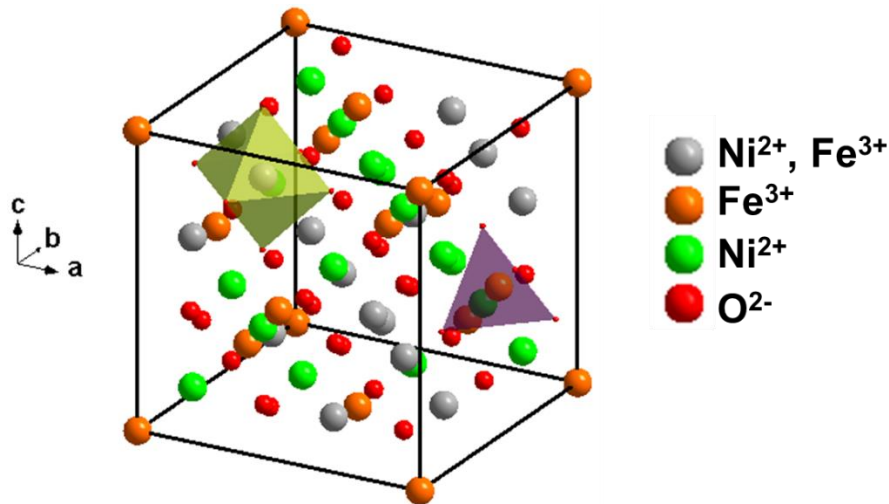


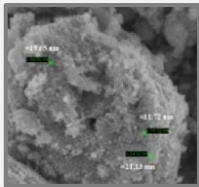
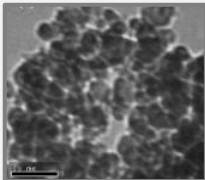
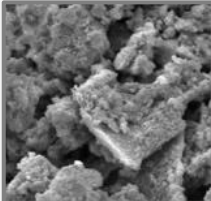
Figura 3. Estructura cristalina de la ferrita de níquel, NiFe₂O₄.

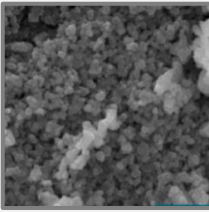
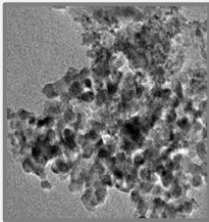
La NiFe₂O₄ se considera un material ferrimagnético blando porque tiene un campo coercitivo bajo y una alta permeabilidad. Además, entre otros materiales magnéticos, tiene una alta: resistividad eléctrica, dureza mecánica, estabilidad química, temperatura de Curie, y alto rendimiento electromagnético junto con costos razonables, lo que le confiere una amplia variedad de aplicaciones en diversos dispositivos electrónicos [26]. Las nanopartículas de NiFe₂O₄ han ganado amplia aceptación debido a dichas propiedades, sin embargo, pocas investigaciones se han realizado sobre el uso de NPs magnéticas de NiFe₂O₄ en el campo biológico. En este sentido, S.V. Bhosale y *et al.* evaluaron la actividad antimicrobiana de NPs de NiFe₂O₄ de 30 nm, sintetizadas por plasma térmico y de 25 nm, sintetizadas por co-precipitación química, con el fin de estudiar si las propiedades superficiales de dichas NPs, influía en la actividad microbiana en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Los autores encontraron que las NPs de NiFe₂O₄ sintetizadas por co-precipitación química no

mostraron actividad antimicrobiana para ninguna de las bacterias en estudio, mientras que las NPs sintetizadas por plasma térmico sólo mostraron inhibición para la bacteria *E. coli*. Los autores observaron que el papel de la morfología, la carga y los defectos superficiales, son importantes para comprender su comportamiento antibacteriano [27].

Se han empleado diversos métodos para obtener NiFe₂O₄, entre los que se encuentran el sonoquímico, técnicas precursoras de citrato, co-precipitación, aleación mecánica, sol-gel, descarga de arco, onda de choque, micelas inversas, hidrotermal y procesos hidrotermales asistidos por ultrasonidos [28]. En la Tabla 3 se presenta un resumen de los principales métodos empleados para la síntesis de NPs de NiFe₂O₄, incluyendo algunos detalles experimentales y el tipo de NPs obtenidas.

Tabla 3. Principales métodos empleados en la síntesis de nanoestructuras de NiFe₂O₄.

Método de Síntesis	Detalles experimentales	Tamaño y morfología	Ref.
Mecanoquímico	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O; Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O; NH ₄ HCO ₃ ; 350°C	10-30 nm 	[28]
Sol-gel	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O; Glicerol; Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O; 400- 800°C	12.71 ± 1.40 nm 	[29]
Síntesis verde	Ni (NO ₃) ₂ .6H ₂ O; Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O; Huevo blanco (albúmina); 600°C	23-47 nm 	[30]

<p>Combustión</p>	<p>$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; <i>H. sinensis</i>; 1000°C</p>	<p>70 nm</p> 	<p>[31]</p>
<p>Co-precipitación</p>	<p>$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Óxido de polietileno (PEO); $\text{NH}_2 \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 300°C</p>	<p>24 nm</p> 	<p>[32]</p>

2.4 Método Mecanoquímico

Las nanopartículas, objeto de estudio de este trabajo de tesis, se obtuvieron a partir de método mecanoquímico. La IUPAC define una reacción mecanoquímica como: “reacción química que es inducida por absorción directa de energía mecánica” con una nota que se refiere a que “cizallamiento, estiramiento, molienda y golpe”, son algunos métodos típicos para la generación de una reacción mecanoquímica [33]. Por otro lado, Gaffet y *et al.* se refieren a la mecanosíntesis como a aquellos procesos en los que se induce una reacción química en las materias de partida, debido únicamente a la acción de molienda continua [34]. La mecanosíntesis es una técnica basada fundamentalmente en reacciones en estado sólido, lo cual significa que los procesos involucrados en la evolución de la microestructura ocurren sin salir de la fase sólida; por ende, no es necesario pasar por los puntos de fusión de los compuestos participantes en la reacción. En términos prácticos, esto se ve reflejado significativamente en una reducción de costos frente a los procedimientos que usualmente involucran cambios de estado. Las reacciones sólidas, producidas mediante esta técnica, corresponden a procesos difusivos a escala atómica inducidos por las condiciones locales de presión y temperatura que se generan en la microestructura de las partículas, debido a la generación de defectos cristalinos,

y a la acumulación de tensión en la red cristalina, producida durante el proceso de la aleación mecánica. El método general de mecano-síntesis, consiste en una serie de procesos que se ilustran en la Figura 4. La reacción ocurre antes del término del tratamiento mecánico (**fase 1**), y es determinada por la excitación térmica, la cual depende de la temperatura de reacción. La aplicación de energía mecánica resulta en un aumento significativo de la velocidad de reacción (**fase 2**); después, ésta se estabiliza y permanece constante bajo las mismas condiciones (**fase 3**). Por último, después de la interrupción del tratamiento, la velocidad de reacción vuelve a disminuir (**fase 4**) [35].

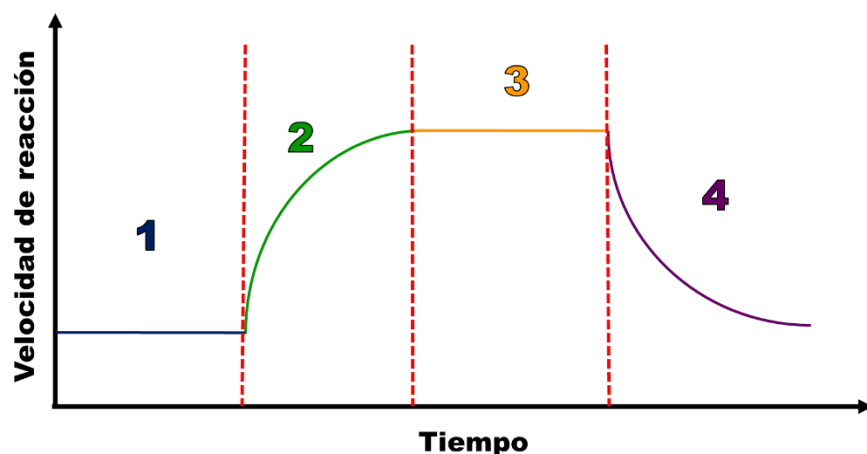


Figura 4. Esquema general de las etapas en un proceso de mecano-síntesis.

La mecanoquímica es una alternativa de síntesis energéticamente eficiente, que evita el uso de grandes cantidades de disolventes nocivos para la salud y el medio ambiente. El proceso de activación mecanoquímica trabaja agregando energía mecánica a los reactivos en estado sólido, produciendo la energía necesaria para superar la barrera energética y llevar a cabo la reacción. Este método de síntesis presenta ventajas muy útiles como: una ruta simple de un solo paso, tiempos de reacción cortos, alto rendimiento, y bajo costo para obtener materiales complejos de óxidos nanoestructurados. Adicionalmente, cumple con 6 de los principios de la química verde, como se muestra a continuación:

Principio 6	Se realiza a bajas temperaturas
Principio 5	No utiliza o utiliza poco disolvente
Principios 3 y 8	Se generan subproductos salinos no tóxicos
Principios 2 y 3	Menos pasos de reacción

Por lo tanto, la mecanoquímica es un método promisorio debido a su facilidad y accesibilidad.

2.5 Bacterias Gram negativas y Gram positivas

Entre las bacterias, la pared celular varía en su complejidad arquitectónica. Esta diferencia sirve de base para dividir las en 2 grandes grupos: Las bacterias Gram positivas y las Gram negativas. Esta división se basa en el hecho de que, por diferencias en la estructura, y la composición de la pared celular, las bacterias se tiñen de diferente color cuando se utiliza una técnica de tinción desarrollada por Christian Gram en 1884.

La tinción diferencial de Gram consiste, básicamente, en teñir el frotis, fijado al calor, con un colorante llamado cristal violeta, y después de lavado con agua, tratarlo sucesivamente con una solución de lugol (yodo más yoduro de potasio), un agente decolorante como el alcohol, o una mezcla de alcohol y acetona. Por último, se emplea un colorante de contraste como la safranina. Las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta, por lo tanto, se ven de un color violeta intenso; mientras que las Gram negativas, que pierden color el violeta con el agente decolorante, toman un color rojo claro a rosa, al teñirse con la safranina.

La pared celular de las bacterias Gram negativas es más delgada que la de las Gram positivas, y contiene además del peptidoglicano (ver Figura 5 y 6), una capa externa con un porcentaje alto de lípidos [36]. En la Tabla 4 se resumen las principales características de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

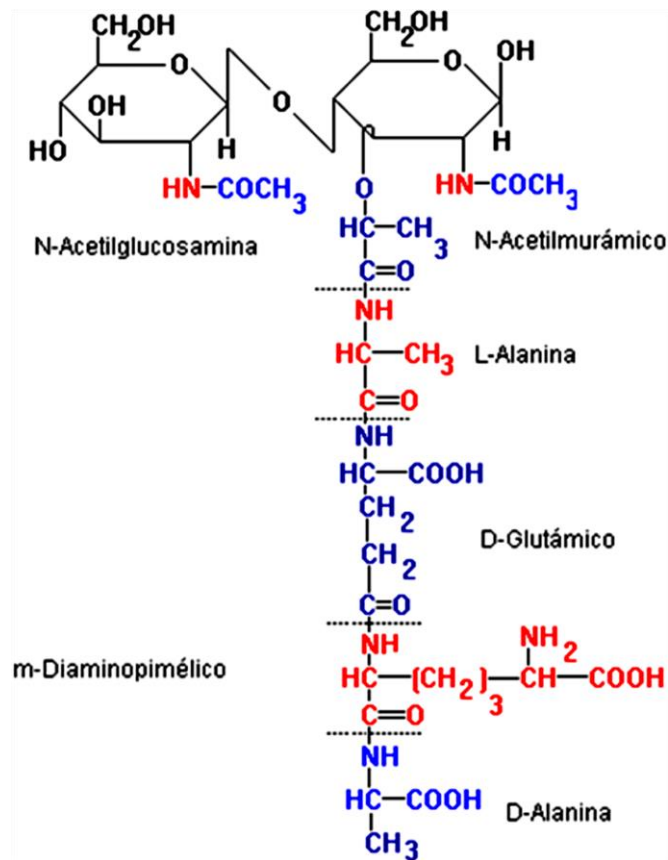


Figura 5. Estructura del Peptidoglicano

Tabla 4. Principales diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas

Característica	Gram positiva	Gram negativa
Estructura de la pared celular	Monocapa gruesa (15-80 nm)	Monocapa delgada (10-15 nm)
Composición de la pared celular	Baja en lípidos (1-4%) peptidoglucano presente formando monocapa, representa el 50% del peso seco de algunas bacterias	Alto en lípidos (11-22%), peptidoglucano presente en una capa rígida, representa el 10% del peso seco. No hay ácidos teicoicos
Susceptibilidad a la penicilina	Más susceptibles	Menos susceptibles
Crecimiento frenado por colorantes básicos como el cristal violeta	El crecimiento se retrasa notoriamente	El crecimiento se retarda menos
Requerimientos nutricionales	Relativamente complejos en muchas especies	Relativamente poco complejos en muchas especies
Resistencia a la ruptura mecánica	Más resistente	Menos resistente

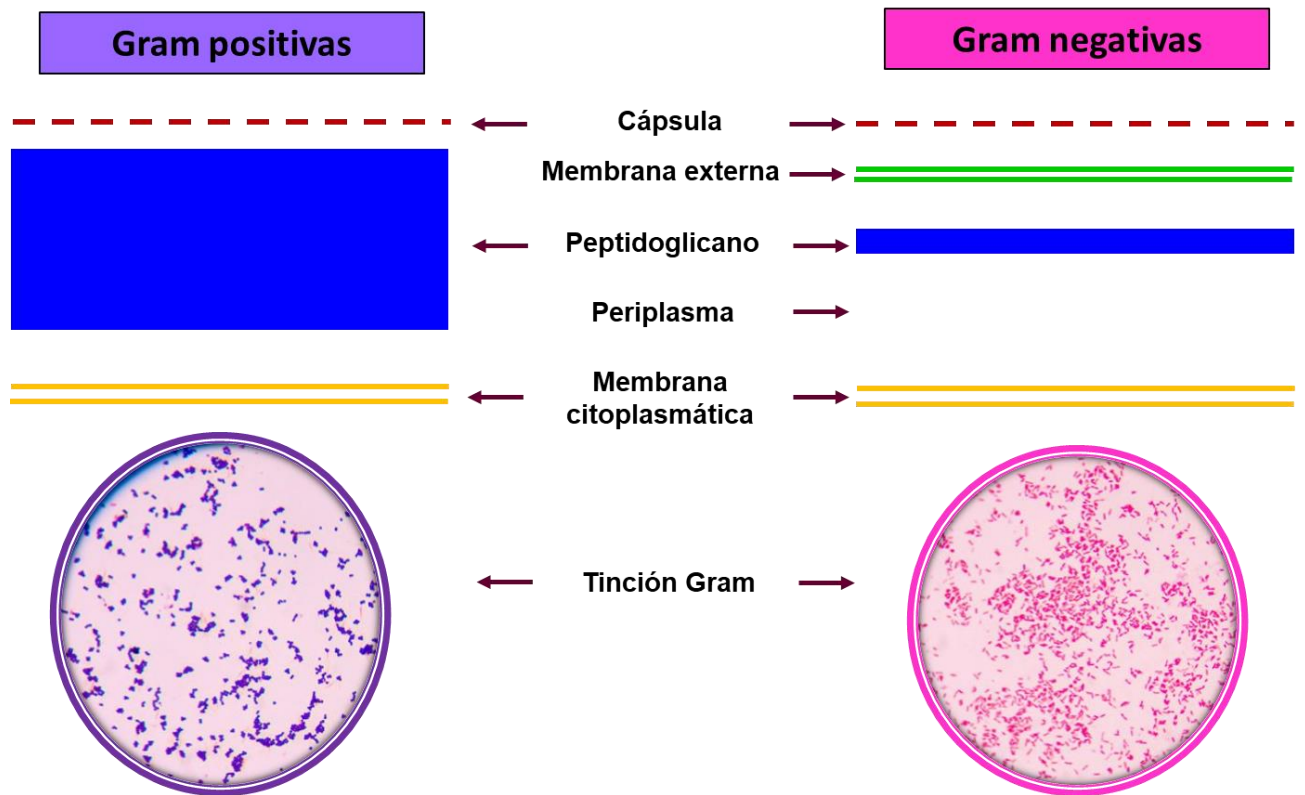



Figura 6. Esquema comparativo de las paredes celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas, y la respectiva tinción de Gram que ocasionan.

2.6 Bacterias multirresistentes

Se denominan “bacterias multirresistentes” a un grupo de bacterias que presentan resistencia a los antibióticos tradicionalmente empleados. Dicha resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso indiscriminado de fármacos y a la automedicación. Estas bacterias resistentes pueden ocasionar infecciones en el ser humano y en los animales, siendo infecciones más difíciles de tratar que las causadas por microorganismos tradicionales no resistentes.

La OMS ha hecho una alerta a nivel mundial, puesto que se trata de una de las mayores amenazas para la salud humana. Por ejemplo, un creciente número de infecciones, como la neumonía, la tuberculosis, o la gonorrea, son cada vez más difíciles y a veces imposibles de tratar, a medida que los antibióticos tradicionales



van perdiendo eficacia. Debido a lo anterior, en este trabajo de tesis se llevó a cabo un estudio de las propiedades antimicrobianas de las NPs de NiO, Fe₂O₄ y NiFe₂O₄ en cepas (no resistentes) de dos bacterias consideradas multirresistentes, con prioridad crítica; *P. aeruginosa* y elevada; *S. aureus*.

2.6.1 *Staphylococcus aureus*

El *S. aureus* es una bacteria con forma esférica con un diámetro aproximado entre 0.8-1.0 µm; no posee flagelos, ni esporas. Pertenece al grupo de las Gram positivas y su agrupación característica es en cúmulo parecido a racimos de uvas. La temperatura óptima de incubación está entre 30-37°C, aunque son capaces de crecer en un rango amplio de temperatura que va desde los 10°C y hasta los 40°C, y soporta una concentración alta de NaCl (15%). Son bacterias anaerobias facultativas que pueden crecer a partir de respiración aerobia o por medio de la fermentación. Puede causar infecciones supurativas, infecciones estomacales y síndrome del choque tóxico. Dentro de las enfermedades más graves que *S. aureus* genera, se encuentran la neumonía, flebitis, meningitis y endocarditis. Una de las cepas de mayor relevancia es *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), observada predominantemente en infecciones nosocomiales, y más recientemente se ha encontrado fuera de hospitales. La resistencia a la meticilina es un indicativo de multirresistencia a antibióticos por parte de las bacterias, justamente en la actualidad se ha incrementado dicha resistencia, lo que ocasiona que la población sea afectada por este tipo de infecciones, causando que el individuo en algunos casos tarde en recuperarse o incluso muera [37].

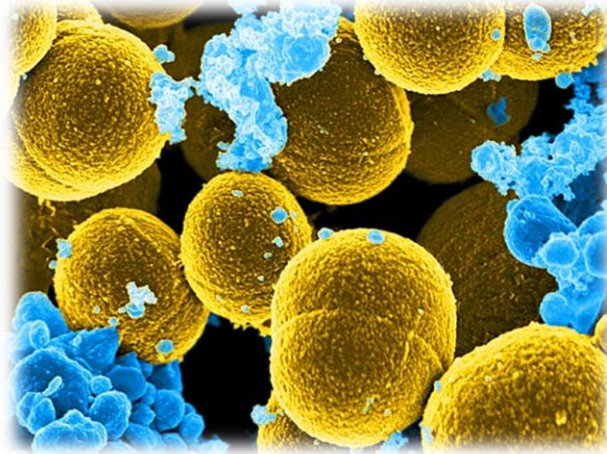


Figura 7. Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) coloreada digitalmente en donde se muestran bacterias *Staphylococcus aureus* de color mostaza y esferoides que estaban en proceso de escapar de su destrucción por los glóbulos blancos humanos de color azul. Ampliación - 20,000x [38].

2.6.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo aeróbico Gram negativo perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. Los bacilos miden aproximadamente de 0.5 a 0.8 μm por 1.5 μm , la mayoría de las cepas son móviles debido a un flagelo polar. Su temperatura de crecimiento óptima es de 37°C, pero puede crecer incluso hasta 42°C. Esta especie bacteriana es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos pueden asimilar. Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón, contrariamente a lo que parece, todos nosotros estamos en contacto diariamente con *P. aeruginosa*, ya que se encuentra en bajas cantidades en nuestros alimentos y en algunos artículos de limpieza. Debido a su alta capacidad de adaptabilidad, son organismos de vida libre que se encuentran en una gran variedad de ecosistemas generalmente formando biopelículas. Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre y las plantas. *P. aeruginosa* representa un problema importante de salud pues se

presenta como un patógeno oportunista generando comúnmente infecciones nosocomiales y afectando a pacientes inmunodeprimidos. Una vez que se establece la infección, la bacteria produce una serie de compuestos tóxicos que causan daño tisular extenso e interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Es una bacteria que presenta alta resistencia natural a distintos antibióticos y a desinfectantes, por lo tanto, ocasiona una alta mortalidad en pacientes infectados [39]. Por tal razón, se están buscando nuevas formas de combatir las infecciones de tipo bacteriano y en este sentido, las nanoestructuras, debido a sus dimensiones de unos cuantos nanómetros y a su gran área superficial específica, resultan candidatos ideales para interactuar con las bacterias.

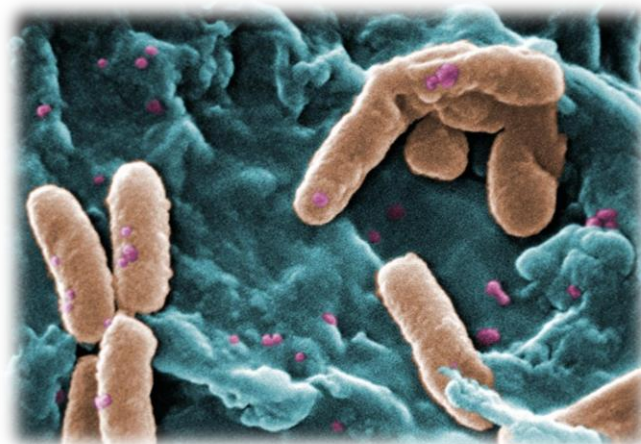



Figura 8. Imagen SEM de *Pseudomonas aeruginosa*. Biblioteca de imágenes de salud pública (PHIL), número de identificación # 10043 [40].

2.7 Mecanismos propuestos para el efecto de las NPs sobre las bacterias

Se ha informado sobre diversos mecanismos alrededor del efecto antibacteriano de los óxidos metálicos nanoestructurados, los cuales de manera general se describen a continuación [2].

- **Estrés oxidativo, formación de especies reactivas de oxígeno (ERO):**


Las ERO, son un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos



metabólicos en los que participa el oxígeno: el anión superóxido O_2^- que es un potente agente oxidante muy reactivo con el agua, el peróxido de hidrógeno H_2O_2 y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) que es el más reactivo, ya que aceptando un electrón más, da lugar a una molécula de agua. Las NPs de óxidos metálicos son capaces de producir distintas especies reactivas de oxígeno, pueden participar en distintos tipos de reacciones en las que pueden sufrir procesos de oxidación o reducción. Las ERO pueden producir efectos nocivos sobre las células como daños en el ADN, daños producidos por oxidación de ácidos grasos polinsaturados y de aminoácidos. La alteración del balance en los mecanismos de producción y eliminación de las ERO, en favor de la producción, origina el estado de estrés oxidativo en la célula. Las NPs de MgO pueden generar O_2^- , mientras que las NPs de ZnO pueden generar H_2O_2 y $\cdot OH$, pero no O_2^- . Por otro lado, las NPs de CuO pueden producir los cuatro tipos de oxígeno reactivo. El O_2^- y el H_2O_2 causan reacciones de estrés menos agudas y pueden ser neutralizados por antioxidantes endógenos, como las enzimas superóxido dismutasa y la catalasa, mientras que el $\cdot OH$ y el O_2^- pueden conducir a la muerte microbiana aguda.

- **Daño en pared–membrana celular por interacción electrostática y acumulación:**

Los grupos electronegativos de los polisacáridos en la membrana bacteriana son sitios de atracción de cationes metálicos. La diferencia de carga entre membranas bacterianas y las NPs de óxidos metálicos conduce a la atracción electrostática, y así se acumulan en la superficie de la bacteria alterando la estructura y la permeabilidad de la membrana celular. Los poros de las membranas se encuentran en el orden de nanómetros, por lo tanto, entre menor sea el tamaño de partícula y mayor el área de superficie, mayor es la eficacia de los óxidos metálicos nanoestructurados. De la misma manera, los cationes extraídos de las NPs de los óxidos metálicos y su acumulación en pared celular crean fosas en ella, llevando a un cambio en la permeabilidad debido a la liberación sostenida de LPS, proteínas de la membrana y factores intracelulares. Además, se ha vinculado este mecanismo




con la interrupción de la replicación ADN de la bacteria y síntesis de ATP, llevándola a su muerte. Un estudio señala que la acción de las NPs depende de los componentes y la estructura de la célula bacteriana.

- **Pérdida de homeostasis por iones metálicos:**

El balance de elementos metálicos es esencial para la supervivencia microbiana, ya que regula las funciones metabólicas al ayudar a las coenzimas, cofactores y catalizadores. Cuando las bacterias tienen un exceso de metales o iones metálicos, habrá un desorden en las funciones metabólicas. Los iones metálicos se unen con el ADN y alteran la naturaleza helicoidal mediante enlaces cruzados entre y dentro de las cadenas de ADN. Los iones metálicos neutralizan las cargas en las LPS y aumentan la permeabilización de la membrana externa. Reportes señalan que las NPs de TiO₂ pueden adherirse a la superficie de las células bacterianas liberando iones y dañando la composición y estructura de la membrana celular, interfiriendo con la función de la membrana celular y causando la fuga de contenido celular, resultando en la muerte bacteriana. Las NPs que contienen Fe²⁺/Fe³⁺ también puede causar la descomposición de las células bacterianas debido a la difusión de iones metálicos generando grandes cantidades de radical hidroxilo y la difusión en las células bacterianas. Otros estudios señalan que las NPs de óxidos metálicos pueden liberar lentamente iones metálicos a través de adsorción, disolución e hidrólisis. Dichos iones son tóxicos y abrasivos para las bacterias, y por lo tanto, lisan las células.

- **Disfunción de proteínas y enzimas:**

La disfunción de la proteína es otro modo de actividad antibacteriana exhibida por NPs de óxidos metálicos. Los iones metálicos catalizan la oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos dando como resultado carbonilos unidos a proteínas. Los niveles de carbonilación dentro de la molécula de proteína sirven como marcador para el daño oxidativo de la proteína. Esta carbonilación de proteínas conducirá a la pérdida de la actividad catalítica en el caso de las enzimas, lo que finalmente



desencadena la degradación de las proteínas. Además, estos iones reaccionan con los grupos -SH de muchas proteínas y enzimas volviéndolos inactivos.

- **Genotoxicidad e inhibición de la señal de transducción:**

Debido a sus propiedades eléctricas, las NPs de óxidos metálicos interactúan con los ácidos nucleicos, en particular el ADN genómico y el plasmídico. Suprimen la división celular de los microbios al alterar los procesos de replicación del ADN cromosómico y del plásmido. Se sabe que la transducción de señales en las bacterias se ve afectada por las NPs de óxidos metálicos. La fosfotirosina es un componente esencial del mecanismo de transducción de señales en bacterias. Estas nanopartículas desfosforilan los residuos de fosfotirosina, lo que inhibe la transducción de señales y en última instancia, obstruye el crecimiento de bacterias. Estudios señalan que las NPs de MgO pueden alterar la expresión de muchas proteínas metabólicas, incluida la regulación de una proteína débil de unión a ésteres de tiamina y riboflavina, y la regulación de una proteína asignada a la ruta crítica del metabolismo celular bacteriano, lo que resulta en una reducción de la actividad metabólica celular, lo que sugiere que las NPs regulan los procesos metabólicos de las bacterias actuando sobre las proteínas diana. Las NPs de CuO pueden regular la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo de nitrógeno bacteriano e inhibir significativamente la actividad del nitrato reductasa y la reductasa de nitrito.

En la Figura 9, se presenta un esquema que resume los mecanismos previamente descritos, por los que las NPs de óxidos metálicos pueden actuar contra las bacterias.

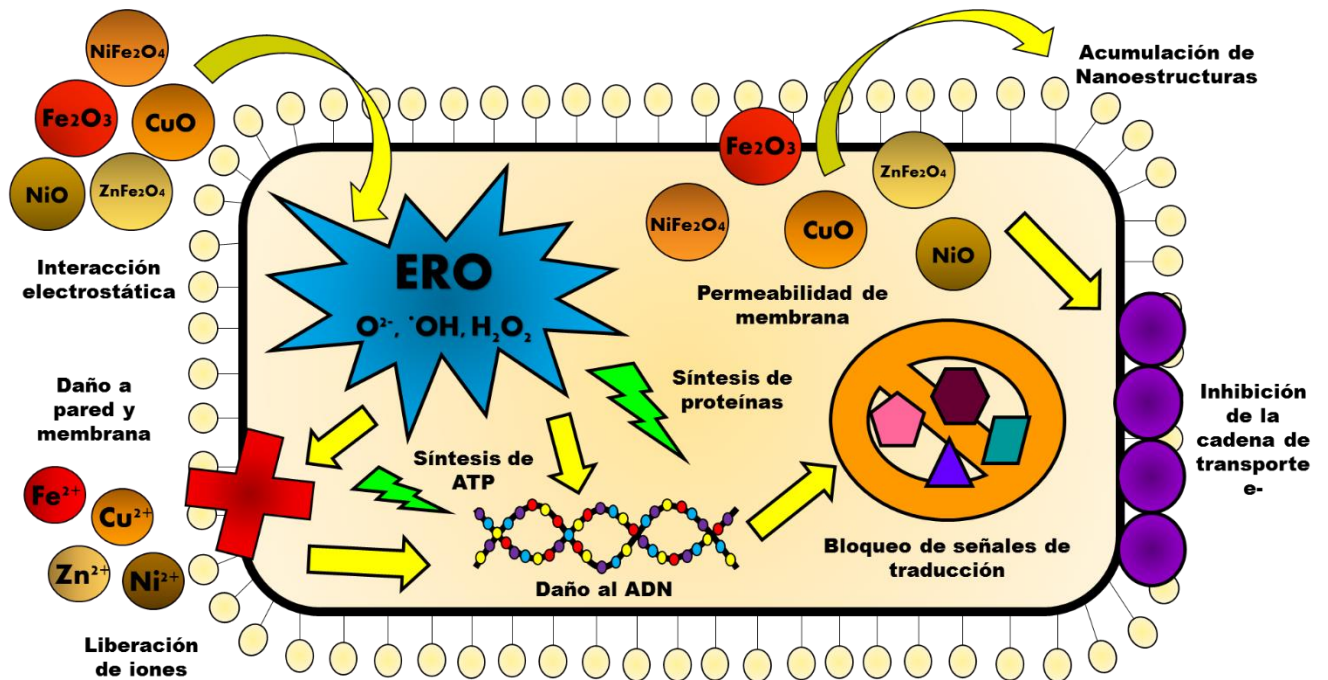


Figura 9. Mecanismos posibles del efecto bactericida de los óxidos metálicos nanoestructurados.

Finalmente, también es importante considerar que los cationes presentes en la superficie de las NPs formadas por óxidos metálicos, son ácidos de Lewis con valencias insaturadas. Por lo tanto, podrían formar enlaces de tipo covalente dativo, con bases de Lewis (grupos nitrogenados y oxigenados), presentes en los aminoácidos y polisacáridos constituyentes de la pared celular. Dicha interacción ácido-base podría generar la lisis de la pared celular [2].

Por todo lo anterior, es importante tener en cuenta que existen diversos mecanismos que pueden estar involucrados en la actividad antimicrobiana de las NPs de los óxidos metálicos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años, las enfermedades infecciosas de tipo bacteriano representan una alerta de peligro para la salud pública, como consecuencia de la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos tradicionales. Se expresa, que algunas cepas bacterianas tanto grampositivas como gramnegativas exhiben este problema crítico de salud a nivel mundial [41]. En este sentido, una cepa de resistencia en nivel crítico es la *P. aeruginosa*, la cual se sabe que causa infecciones graves en ciertos individuos inmunocomprometidos. Además, es uno de los patógenos adquiridos nosocomialmente más frecuentes, infecta a pacientes con cáncer que reciben quimioterapia, pacientes con quemaduras, aquellos con respiradores o con catéteres, pacientes con SIDA y otros. En particular, es la causa de mortalidad en casi todos los individuos con fibrosis quística (FQ). Las anomalías en el tejido pulmonar de pacientes con FQ permiten la colonización de *P. aeruginosa*, causando inflamación prolongada, daño tisular y eventualmente insuficiencia respiratoria [42]. De manera análoga, el *S. aureus*, cepa resistente a la meticilina (MRSA) en nivel elevado, puede causar infecciones supurativas, infecciones estomacales y síndrome del choque tóxico. Dentro de las enfermedades más graves que *S. aureus* genera, se encuentran la neumonía, flebitis, meningitis y endocarditis [43]. Evidenciando este problema, se ha propuesto el uso de NPs como agentes antimicrobianos para la prevención de este tipo de enfermedades, sin embargo, muchas propuestas como las NPs de plata o cobre pueden resultar costosas y sus metodologías de síntesis bastante complejas en muchos casos, debido a, que en las rutas de síntesis convencionales se pueden involucran tiempos largos de reacción, varios pasos de síntesis, cambios de estado pasando por el punto de fusión de los precursores, y tratamientos térmicos de al menos 800°C para obtener la fase deseada. Por tanto, es muy importante desarrollar sistemas que tengan actividad antimicrobiana que no sean fácilmente susceptibles de resistencia, y que se pueden producirse de forma eficiente y económica.

4. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a lo anterior, surge una necesidad inminente de encontrar alternativas para el tratamiento bacteriano y en este sentido, la nanotecnología se ha mostrado como estrategia promisoría para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos. Por ende, las NPs han despertado gran interés gracias a sus propiedades fisicoquímicas únicas, con aplicaciones en diversos campos [44]. Entre los diferentes materiales explorados, las ferritas tipo espinela, con fórmula mínima MFe_2O_4 (donde, M podría ser Co, Mn y o Ni), emergen como materiales prometedores, particularmente para aplicaciones biomédicas [45]. Las propiedades de las NPs se pueden alterar en función del tamaño, forma o composición, de este modo se ha informado que las NPs con un tamaño de partícula muy pequeño podrían mostrar una buena actividad antimicrobiana [46]. Por lo tanto, en el presente proyecto de investigación se lleva a cabo la obtención de NPs de NiO, Fe_2O_3 y $NiFe_2O_4$ mediante mecano-síntesis, brindando la oportunidad de fabricar nuevos sólidos nanoestructurados con propiedades peculiares diferentes de las muestras en *bulk* obtenidas por métodos estándar, y en este caso, especialmente con propiedades microbicidas. La mecanoquímica, como técnica de síntesis no convencional, presenta algunas ventajas con relación a otros métodos de síntesis. Por ejemplo, es posible obtener diferentes ferritas a partir de la molienda de cantidades estequiométricas de sus sales metálicas precursoras, durante un tiempo de molienda corto y sin llevar a cabo un tratamiento térmico posterior. Por lo tanto, la mecanoquímica puede proporcionar una ruta simple, de alto rendimiento, y de bajo costo, para la obtención de materiales complejos de óxidos, con dimensiones de unos cuantos nanómetros.



5. HIPÓTESIS

- La activación mecánica permitirá obtener nanopartículas de NiO, Fe₂O₃, y NiFe₂O₄, con actividad microbicida frente a cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener nanopartículas de NiO, Fe₂O₃ y NiFe₂O₄ mediante un método mecanoquímico para su evaluación como agentes microbicidas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Llevar a cabo la mecano-síntesis de NPs de NiO, Fe₂O₃ y NiFe₂O₄.
- Caracterizar las nanopartículas de NiO, Fe₂O₃ y NiFe₂O₄ mediante diferentes técnicas espectroscópicas, magnéticas y por HR-TEM.
- Evaluar la actividad microbicida de las nanopartículas de NiO, Fe₂O₃ y NiFe₂O₄ en cepas de *S. aureus* y de *P. aeruginosa*.
- Comparar la eficiencia en la actividad microbicida entre las nanopartículas de NiO, Fe₂O₃ y NiFe₂O₄.



7. PARTE EXPERIMENTAL


En esta sección se describen los reactivos y la metodología empleada para sintetizar las NPs de NiO, Fe₂O₃ y NiFe₂O₄, así, como los equipos empleados en su caracterización. También se presenta la metodología que se llevó a cabo para evaluar la actividad microbicida de las NPs obtenidas.

❖ Reactivos y Materiales

- ✓ Acetato de níquel tetrahidratado Ni(CH₃COO)₂·4H₂O, Aldrich, 98%. P.M.= 248.86 g/mol.
- ✓ Cloruro de hierro (III) hexahidratado, FeCl₃·6H₂O, Sigma-Aldrich, ≥98%. P.M.= 270.30 g/mol.
- ✓ Acetilacetonato de níquel, Ni(C₅H₇O₂)₃, Aldrich, 95%. P.M.= 256.91 g/mol.
- ✓ Acetilacetonato de hierro, Fe(C₅H₇O₂)₃, Aldrich, ≥99.9%. P.M.= 256.91 g/mol.
- ✓ Hidróxido de sodio, NaOH, Sigma-Aldrich, ≥97%. P.M.= 40 g/mol.
- ✓ Agua destilada, H₂O.
- ✓ Acetona, CH₃(CO)CH₃, Sigma-Aldrich, 99.5%.
- ✓ Mortero de Ágata

❖ Equipos

- ✓ Difractómetro de Rayos X Siemens D5000. Los difractogramas se obtuvieron con una radiación Cu K α (λ = 1.5406 Å) en el laboratorio de Estado Sólido de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- ✓ Espectrofotómetro UV-Vis Ocean Optics USB2000, del laboratorio de sistemas híbridos y nanoespectroscopia ICAT (Instituto de Ciencias Aplicadas y de Tecnología) UNAM.
- ✓ Espectrómetro de Absorción Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) Thermo Nexus del Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del ICAT, UNAM.

-
- 
- ✓ Espectrofotómetro de dispersión Raman WITec. Láser Nd: YVO4 de 532nm con un aumento de 100x del laboratorio LUCE, ICAT, UNAM.
 - ✓ Microscopio FEI Tecnai F20, emisión de campo de 200kV S / TEM con una lente X-TWIN y una pistola de electrones de emisión de campo de alto brillo (FEG). Instituto Mexicano del Petróleo.
 - ✓ Magnetómetro de muestra vibrante (VSM) (QUANTUM DESIGN MPMS3) con un campo aplicado a 20000 Oe. Instituto de investigaciones en Materiales, UNAM.

❖ **Síntesis de las NPs de NiO, Fe₂O₃ y NiFe₂O₄.**

Las nanopartículas de NiO, Fe₂O₃ y NiFe₂O₄, se obtuvieron mediante reacciones en estado sólido, llevándose a cabo la reacción debido a la energía mecánica proporcionada mediante la molienda. De acuerdo a lo anterior, la síntesis de las NPs de NiO, Fe₂O₃ y NiFe₂O₄, consistió en la molienda de las sales metálicas precursoras respectivas (previamente molidas = activación de la sal), en relación estequiométrica, con NaOH (previamente molido). Dicha mezcla se molió en un mortero de ágata hasta no observar cambios, y obtener una mezcla totalmente homogénea (alrededor de 15 min). Los polvos obtenidos se lavaron 3 veces con H₂O destilada y 2 con acetona, y fueron separados por centrifugación, en cada ocasión. Finalmente, las muestras fueron calcinadas a 400°C por 2h. A la par, fueron evaluadas las temperaturas de calcinación de 200°C, 600°C, y 800°C. Sin embargo, 400°C presentó los mejores resultados respecto a tamaño de partícula y fase cristalina única.

El proceso de mecanosíntesis para las NPs de NiO se muestra de manera general en la Figura 10. Se realizó el mismo procedimiento para las NPs de Fe₂O₃ y NiFe₂O₄, sin embargo, para éstas NPs, la calcinación se realizó antes de los lavados debido a la solubilidad de los productos.

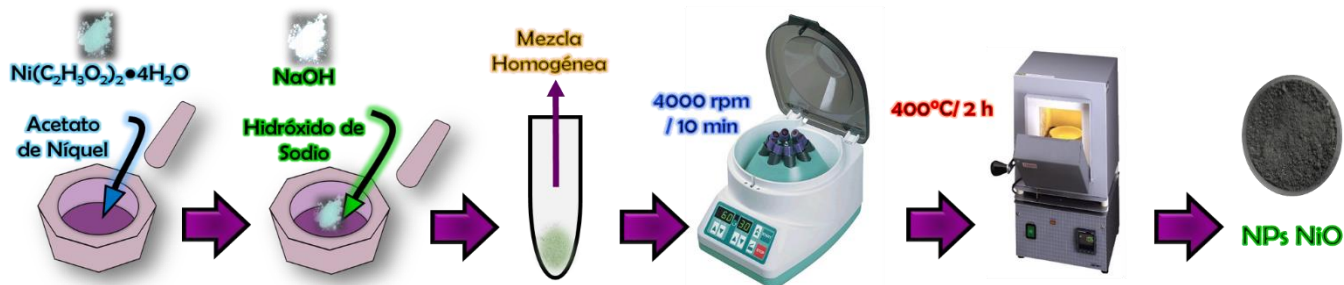
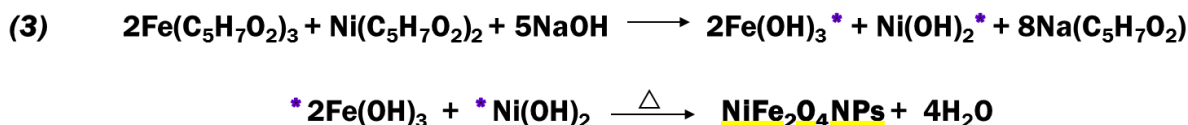
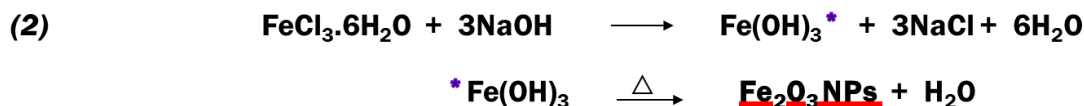
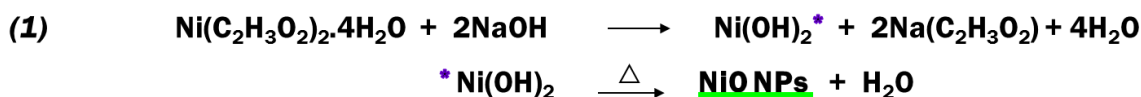


Figura 10. Esquema general de la síntesis de las NPs de NiO.

Cada molienda se realizó empleando las sales precursoras de acuerdo a cada sistema, y teniendo en cuenta la relación estequiométrica respectiva, en presencia de una base (NaOH), de acuerdo a las siguientes reacciones químicas:



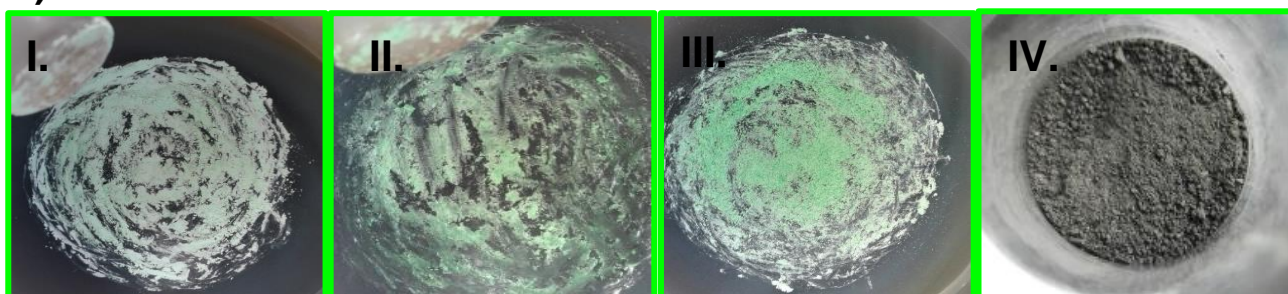
* Producto obtenido después de la activación mecánica.

La cantidad de partida de la sal metálica empleada fue de 5×10^{-4} moles (124.4 mg), 2×10^{-3} moles (540.6 mg), y 1×10^{-4} moles (70.6 mg del precursor de Ni^{2+} , y 25.7 mg del precursor de Fe^{3+}), para las NPs de NiO, Fe_2O_3 y NiFe_2O_4 , respectivamente. Teniendo en cuenta las cantidades empleadas para llevar a cabo las reacciones, y las obtenidas al finalizar la síntesis, el rendimiento alcanzado de la reacción química

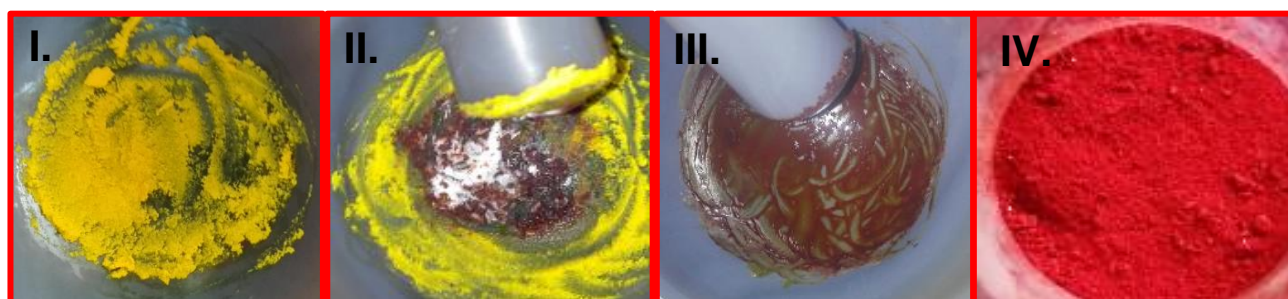
general fue de: 60%, 91%, y 71% para las NPs de NiO, Fe₂O₃ y NiFe₂O₄, respectivamente.

Las fotografías del proceso de síntesis son presentadas en la Figura 11, iniciando con la activación de la sal metálica, posterior molienda de las sales respectivas en presencia de NaOH, al finalizar la molienda, y el posterior tratamiento térmico, como se muestra a continuación.

a).



b).



c).

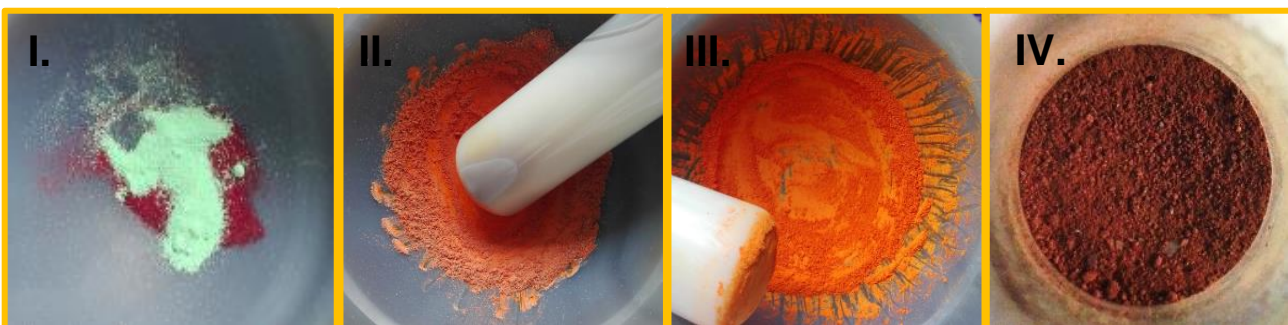


Figura 11. Proceso de obtención de las NPs de: **a)** NiO, **b)** Fe₂O₃ y **c)** NiFe₂O₄. I. Activación de la sal metálica correspondiente, II. Molienda de la sal metálica en

presencia de NaOH, **III.** Fin de la molienda, cuando no se observan cambios y **IV.**
Producto obtenido después de los lavados y del tratamiento térmico.


❖ **Evaluación de la actividad microbicida de las NPs de NiO, Fe₂O₃ y NiFe₂O₄.**

✚ **Reactivos y Materiales**

- ✓ Agar de soya tripticaseína, TSA (20 g -TSA BD Bioxon™, 500 ml - Agua destilada UV/UF)
- ✓ Caldo de soya tripticaseína, TSA (30 g -TSB BD Bioxon™, 500 ml - Agua destilada UV/UF)
- ✓ Buffer Trizma-EDTA pH 7.6 (0.372 g - EDTA (1 mM), 1.576g -Trizma® clorohidrato (10mM) y 1 L - Agua destilada UV/UF)
- ✓ Tubos de microcentrifugación de 1.5 mL (Axigen, cónicos con tapa de presión)
- ✓ Tubos para centrifuga de 15 mL (Falcon™ cónicos, tapa de rosca estériles)
- ✓ Placas de 96 pozos y 12 pozos estériles
- ✓ Cajas petri de polietileno 35X10mm (empaque 10X estéril)
- ✓ Esterilizador UV
- ✓ H₂O destilada UV/UF
- ✓ Cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* provenientes del American Type Culture Collection (ATCC: 23235) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC:43636), mantenidas bajo ultracongelación (-80°C) en medio con DMSO (2.0 g - Mycoplasma broth base (20 g/L) y 5 ml - DMSO al 5%)

✚ **Equipos**

Todos los equipos pertenecen al laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM bajo la Certificación ISO:9001:2015 Sistemas de gestión de la calidad (<http://www.odonto.unam.mx/es/laboratorios-lifo>).

-
- 
- ✓ Espectrofotómetro UV-Vis FilterMax F5 Multi-mode microplate reader. Molecular devices
 - ✓ Espectrofotómetro UV-Vis eppendorf Photometer
 - ✓ Incubadora Fisher Scientific
 - ✓ Cámara de anaerobiosis COY
 - ✓ Entrecruzador de rayos UV Bio Rad

La susceptibilidad bacteriana de *S. aureus* y *P. aeruginosa* frente a las NPs de NiO, Fe₂O₃ y NiFe₂O₄ fue evaluada mediante tres ensayos:

- 1). Susceptibilidad bacteriana en TSB.
- 2). Susceptibilidad bacteriana en TSA
- 3). Susceptibilidad bacteriana en TSA con suplemento de NPs.


A continuación, se describen las condiciones de cultivo y el procedimiento para cada uno de los experimentos.

- Principios de las condiciones de cultivo

Las cepas fueron cultivadas en agar simple (40 g de agar de soya tripticaseína (TSA), en 1 L de H₂O destilada UV/UF) fueron incubadas durante 3 días dentro de una cámara de anaerobiosis con un ambiente reductor de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂, para la cepa anaerobia facultativa *S. aureus*, y en incubadora con aerobiosis a 35°C para la cepa *P. aeruginosa*.

- Procedimiento de las condiciones de cultivo

Las cepas se descongelaron de manera estéril en un cuarto de microbiología. Con mechero, y asa bacteriológica esterilizada en el fuego previamente, se realizó el sembrado en técnica de estriado cruzado, se etiquetaron las cajas petri para después llevarse a la cámara de anaerobiosis y a la incubadora en aerobiosis, para las condiciones requeridas por cada cepa bacteriana. Se realizaron dos resiembras con estría triple, para la corroboración de purezas de cada cepa. con morfología de



colonia, con ayuda del estereomicroscopio (1x y 3x), cada siembra se realizó por duplicado para garantizar la viabilidad y descartar la contaminación del cultivo, para cada cepa. Después de 3 días, el crecimiento del cultivo fue recolectado y colocado en tubos de centrifugación de 15 mL que contenían 5 mL de TSB. Las células se resuspendieron y fueron medidas con un espectrofotómetro para calcular la densidad óptica de 1 (OD₁) a una $\lambda = 600$ nm, que es considerada como equivalente a 10⁹ células bacterianas (OD₁ = 10⁹) con absorbancia igual a 1. Una vez obtenida OD₁, se realizaron diluciones hasta obtener las correspondientes a 10⁴, 10³ y 10², células, empleadas en los distintos experimentos.

- Procedimiento del ensayo 1: susceptibilidad bacteriana en TSB.

Se colocaron 100 μ L de cada una de las dispersiones de 10 a 0.625 mg/mL, de cada sistema de NPs, obtenidas de las diluciones seriadas (1:2), por triplicado, en cada uno de los pozos correspondientes. A cada uno de estos pozos se agregaron 100 μ L de bacteria (dilución 10³) (siendo, placa 1: *S. aureus* y placa 2: *P. aeruginosa*). Para el control positivo (CP+) se usaron 100 μ L de bacteria y 100 μ L de caldo TSB, para el control (CN-), 100 μ L de bacteria y 100 μ L de amoxicilina de concentración 1 mg/mL, y como controles alternos, 200 μ L de caldo TSB, en cada una de las placas. Adicionalmente, se realizó una tercera placa de control, en la que se depositaron 100 μ L de cada sistema de NPs sin bacterias y 100 μ L de caldo TSB. La prueba se realizó por triplicado en cada sistema de NPs para las tres placas. Un esquema general de la distribución de los sistemas de NPs, CP+, CN-, y caldo TSB, en los pozos de las placas, se muestra en la Figura 12, del mismo modo se realiza para todas las placas. Posteriormente, se incubaron en cámara de anaerobiosis y aerobiosis durante 3 días, a 160 rpm en una plataforma de agitación, selladas con parafilm y cubiertas con plástico adherente. Al concluir el tiempo de incubación (3 días), se retiraron las placas de 96 pozos, y se diluyeron en placas nuevas utilizando 90 μ L del buffer Trizma-EDTA pH 6.5 (TE) y 10 μ L de cada pozo, y se procedió a medir cada una de las placas con ayuda de un espectrofotómetro a una $\lambda = 595$ nm. Los datos obtenidos de la lectura de medición de absorbancia, se almacenaron en una base de datos en Excel, donde cada una de las lecturas se determinaron con

diluciones 1:10 que posteriormente fueron ajustadas la fórmula de $(C_1V_1:C_2C_2) \cdot (\text{Dilución})$ ajustada como: $C_2 = (C_1 \cdot V_1) / (V_2) \cdot 10$, además, se restó la densidad de la absorbancia de NPs (placa 3) a cada una de las lecturas en las dispersiones correspondientes.

Prueba de susceptibilidad bacteriana con Nanopartículas (NPs)	
NPs	
NiO - NPs de óxido de Níquel - 7 ± 1 nm	
Fe ₂ O ₃ - NPs de óxido de Hierro - 22 ± 10 nm	
NiFe ₂ O ₄ - NPs de Ferrita de Níquel - 5 ± 1 nm	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 mg/mL	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL	CP+	CN-
B	10 mg/mL	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL	CP+	CN-
C	10 mg/mL	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL	CP+	CN-
D											CP+	CN-
E											CP+	CN-
F	10 mg/mL	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL		TSB 200 µL	TSB 200 µL			CP+	CN-
G	10 mg/mL	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL		TSB 200 µL	TSB 200 µL			CP+	CN-
H	10 mg/mL	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL		TSB 200 µL	TSB 200 µL			CP+	CN-

Figura 12. *Ensayo 1).* Susceptibilidad bacteriana en TSB. Esquema general de la posición de los sistemas de NPs, CP+, CN-, y TSB, en los pozos de las placas. Se repite la misma distribución de las placas 1-3 correspondientes para los ensayos con cada cepa bacteriana y el control de densidades ópticas de NPs.

- Procedimiento del ensayo 2: susceptibilidad bacteriana en TSA.

Los sistemas de NPs fueron preparados en un matraz con TSA para cada una de las dispersiones de 5 a 0.625 mg/mL, de cada sistema. Una vez preparadas las dispersiones, a las respectivas diluciones en agar, se esterilizaron a 121°C durante 30 minutos y expulsión lenta de presión. Posteriormente, antes de gelificar los sistemas de NPs, fueron vertidos en placas de 12 pozos hasta enfriar (≈ 1 h). En cada uno de los pozos se sembró 50 μ L de las cepas bacterias en las diluciones 10^4 , 10^3 , y 10^2 . Cada sistema de NPs fue distribuido de acuerdo a la organización por placa junto a las diluciones bacterianas, como se muestra en la Figura 13. Del mismo modo se organizaron las placas para los demás sistemas de NPs, y una placa para cada bacteria bajo estudio.

























5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL	Bacteria
				10^4
5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL	
				10^3
5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL	
				10^2

Figura 13. *Ensayo 2*). Susceptibilidad bacteriana en TSA. Esquema general de la posición de las respectivas dispersiones de 5 a 0,625 mg/mL, para cada uno los sistemas de NPs, y la dilución bacteriana respectiva, en los pozos de las placas en TSA. Se realizó el mismo tipo de distribución en placa para cada uno de los sistemas de NPs, y para cada bacteriana bajo estudio.

Las cajas correspondientes a *S. aureus* se colocaron en la cámara de anaerobiosis y las cajas de *P. aeruginosa* se colocaron en aerobiosis por 3 días, bajo las condiciones de cultivo previamente mencionadas.

- Procedimiento del ensayo 3: susceptibilidad bacteriana en TSA con suplemento de NPs.

Se prepararon cajas de 12 pozos con TSA y se dejaron hasta gelificar (≈ 1 h). Posteriormente, se agregaron 30 μ L (para *S. aureus*) y 200 μ L (para *P. aeruginosa*) de cada uno de los sistemas de NPs, a sus respectivas dispersiones de 5, 4, 3, 2, y, 1 mg/mL en TSB (a fin de evaluar dispersiones intermedias entre los 5 a 1 mg/mL), de acuerdo a la distribución en placa que se muestra en la Figura 14, junto con los respectivos controles. Una vez gelificado y absorbidas por completo las dispersiones de NPs, se agregaron 30 μ L de dilución bacteriana 10^2 para *P. aeruginosa* y 10^3 para *S. aureus*, a cada uno de los pozos. Las cajas correspondientes a *S. aureus* se colocaron en la cámara de anaerobiosis (por 3 días) y las cajas de *P. aeruginosa* se colocaron en aerobiosis (por 24h).

NiO NPs	5 mg/mL	4 mg/mL	3 mg/mL	2 mg/mL	Bacteria
<i>P. aeruginosa</i>					10^2
					
					













NiO NPs	1 mg/mL	CP+	CN-	TSA	Bacteria
<i>P. aeruginosa</i>					10^2
					
					

Figura 14. *Ensayo 3*). Susceptibilidad bacteriana en TSA con suplemento de NPs. Esquema general de la posición de las respectivas dispersiones de 5 a 1 mg/mL por triplicado, para cada uno de sistemas de NPs, el CP+, CN-, y TSA, en los pozos de las placas en agar (por cada sistema de NPs se emplearon 2 placas de 12 pozos). Se realizó el mismo tipo de distribución de la placa para cada uno de los sistemas de NPs, y para cada bacteria bajo estudio.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de esta investigación se presentan y analizan de acuerdo a cada uno de los tres sistemas de estudio, en el siguiente orden: NPs de NiO, NPs de Fe₂O₃ y NPs de NiFe₂O₄. Por último, se muestran los resultados de las pruebas microbicidas.

8.1 Caracterización de las NPs de NiO.

❖ Difracción de Rayos X en polvo (DRX)

Las NPs de NiO obtenidas a partir de la metodología descrita en la sección 7, fueron caracterizadas por DRX. Como se observa en el difractograma que se presenta en la Figura 15, todos los picos de difracción corresponden con los informados en la tarjeta cristalográfica (*International Centre for Diffraction Data*) ICDD 00-078-0429 para el NiO, en un sistema cristalino cúbico, con un grupo espacial Fm3m y parámetros de red $a = b = c = 4.1771 \text{ \AA}$. Éste sistema se presenta como fase única.

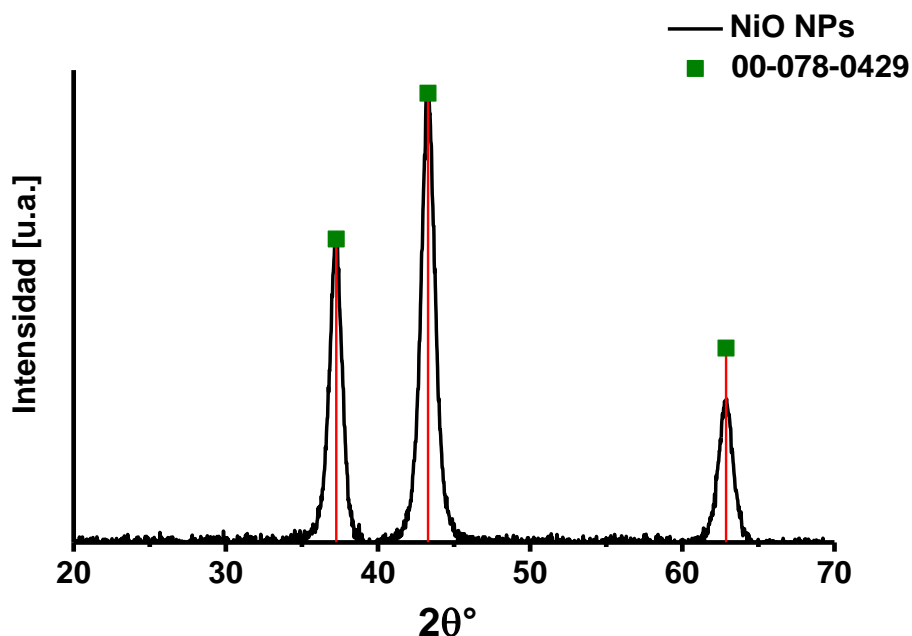


Figura 15. Difractograma de las NPs de NiO.

En la Tabla 5 se muestra la posición de cada pico de difracción y la distancia interplanar correspondiente.

Tabla 5. Posición de los picos de difracción $2\theta^\circ$ presentes en los patrones de DRX en polvo de las NPs de NiO.

	Tarjeta cristalográfica 00-078-0429		NPs de NiO
Reflexión	d [Å]	$2\theta^\circ$	$2\theta^\circ$
(111)	2.4116	37.29	37.23
(200)	2.0885	43.32	43.24
(220)	1.4768	62.94	62.88

Se calculó el diámetro promedio de cristalito de las NPs de NiO, a partir del ancho medio de cada uno de los picos de difracción, empleando la ecuación de *Scherrer*

$$D = \frac{k * \alpha}{\beta * \cos \theta}$$

Ecuación 1. Ecuación de *Scherrer* empleada para obtener el tamaño promedio de cristalito.

Donde,

k = factor de forma del cristal y su valor es de 0.9

α = longitud de onda de la radiación utilizada ($\lambda_{Cu} = 1.54060 \text{ \AA}$)

β = ancho a la altura media del pico de difracción de la muestra

θ = posición del pico de difracción.

De acuerdo a lo anterior, con los picos correspondientes a las reflexiones de los planos (111), (200) y (220), el tamaño promedio obtenido para las NPs de NiO fue de $7 \pm 0.6 \text{ nm}$.

❖ Espectroscopia Raman

Las NPs de NiO fueron caracterizadas por espectroscopia Raman. El espectro Raman correspondiente se presenta en la Figura 16. Donde se observan 3 señales principales, en la región de 350 a 1800 cm^{-1} . La señal con un máximo en 500 cm^{-1} , se asigna al primer orden del modo transversal óptico (TO) y longitudinal óptico (LO), la señales alrededor de los 738 y 1076 cm^{-1} corresponden a la combinación del segundo orden, 2TO y 2LO, respectivamente y la banda alrededor de 1425 cm^{-1} corresponde a la dispersión de dos magnones (2M), de acuerdo a lo informado en la literatura. Este espectro es característico de NPs de NiO, como ha sido informado por otros grupos de investigación [47].

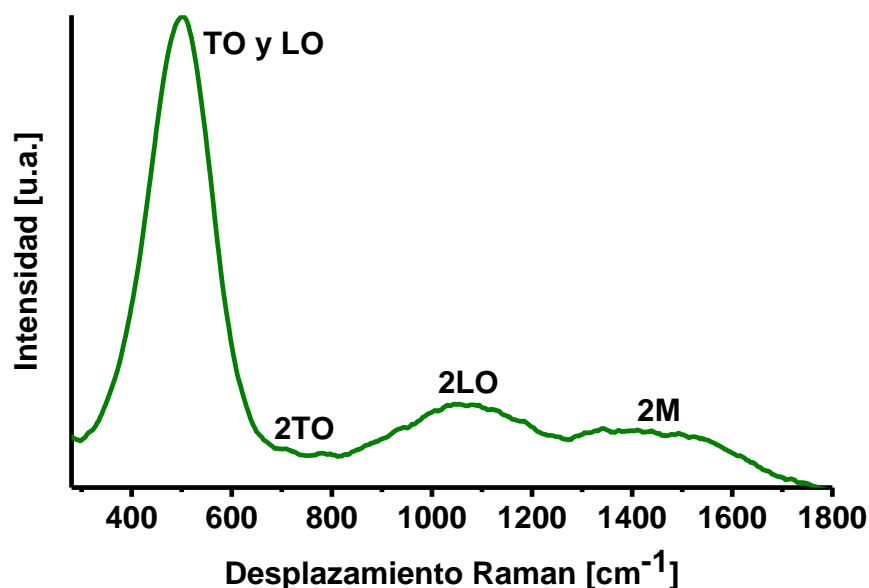


Figura 16. Espectro Raman de las NPs de NiO

❖ Espectroscopia FTIR

Las NPs de NiO obtenidas, fueron caracterizadas por espectroscopia FTIR obteniéndose el espectro que se muestra en la Figura 17.

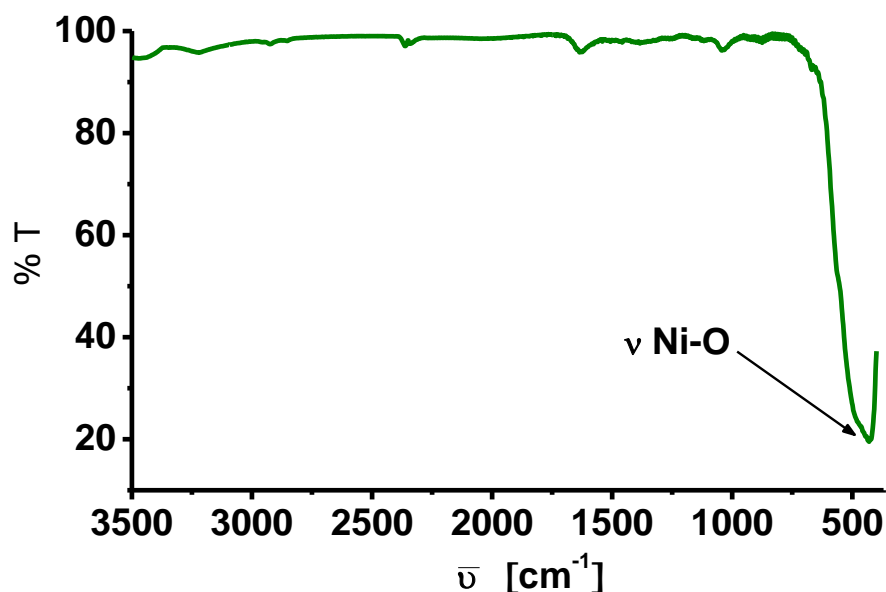


Figura 17. Espectro FTIR de las NPs de NiO

En la Figura 17, se observa una señal en 430 cm^{-1} que corresponde a la vibración de estiramiento del enlace Ni-O, de acuerdo con lo informado en la literatura [48]. En este espectro no se observan bandas intensas debido a la absorción de agua.

❖ Espectroscopia de absorción electrónica UV-Visible.

Las NPs de NiO obtenidas, fueron caracterizadas por espectroscopia de absorción electrónica en la región UV-Vis, en polvo, empleando la técnica de reflectancia difusa. En la Figura 18 se muestra el espectro de absorción de dichas NPs, observándose una banda de absorción de 250 a 350 nm, donde el borde de absorción está relacionado con la energía de la brecha prohibida del sistema. Es decir, a la transición de electrones de la banda de valencia (BV) a la banda de conducción (BC).

El Ni²⁺ en un compuesto molecular presenta 3 transiciones alrededor de $\lambda = 394 \text{ nm}$ (${}^3T_1(F) \rightarrow {}^3T_1(P)$), $\lambda = 721 \text{ nm}$ (${}^3T_1(F) \rightarrow {}^3A_2(F)$), y $\lambda = 1100 \text{ nm}$ (${}^3T_1(F) \rightarrow {}^3T_{2g}(F)$) [49]. Sin embargo, para un material nanoestructurado de NiO no se esperan observar dichas transiciones.

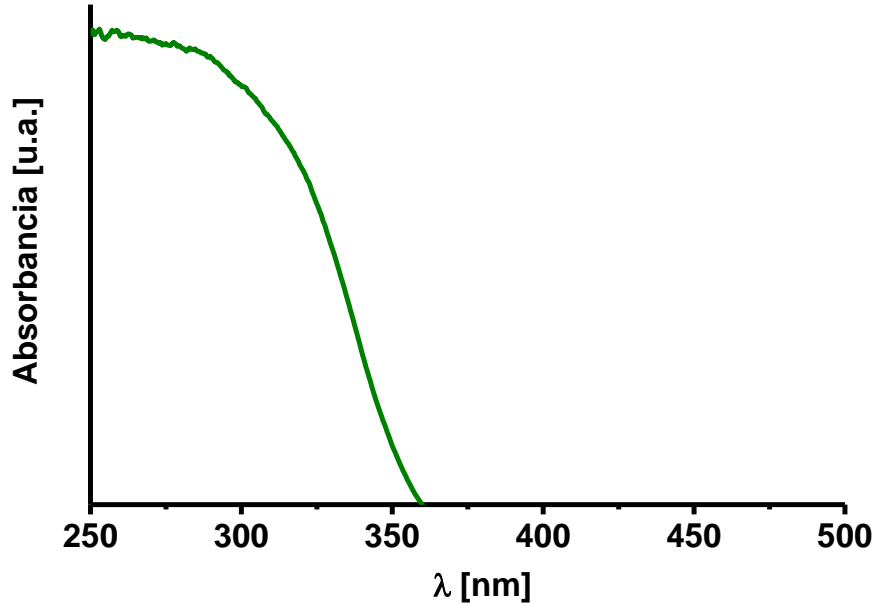


Figura 18. Espectro de absorción electrónica UV-Vis de las NPs de NiO.

Adicionalmente, a partir del modelo de *Tauc* (Ecuación 2), se determinó un valor de 3.44 eV para la energía de brecha prohibida con transición directa de las NPs de NiO, como se observa en la Figura 19.

$$(\alpha h\nu)^{\frac{1}{r}} = A (h\nu - E_g)$$

Ecuación 2. Ecuación de *Tauc* empleada para calcular el valor de la banda prohibida.

Donde,

α = es el coeficiente de absorción

$h\nu$ = es la energía del fotón incidente

r = depende de la naturaleza de la transición

$r = \frac{1}{2}$ transiciones directas $r = 2$ transiciones indirectas

A = es una constante

E_g = es el valor de la banda prohibida

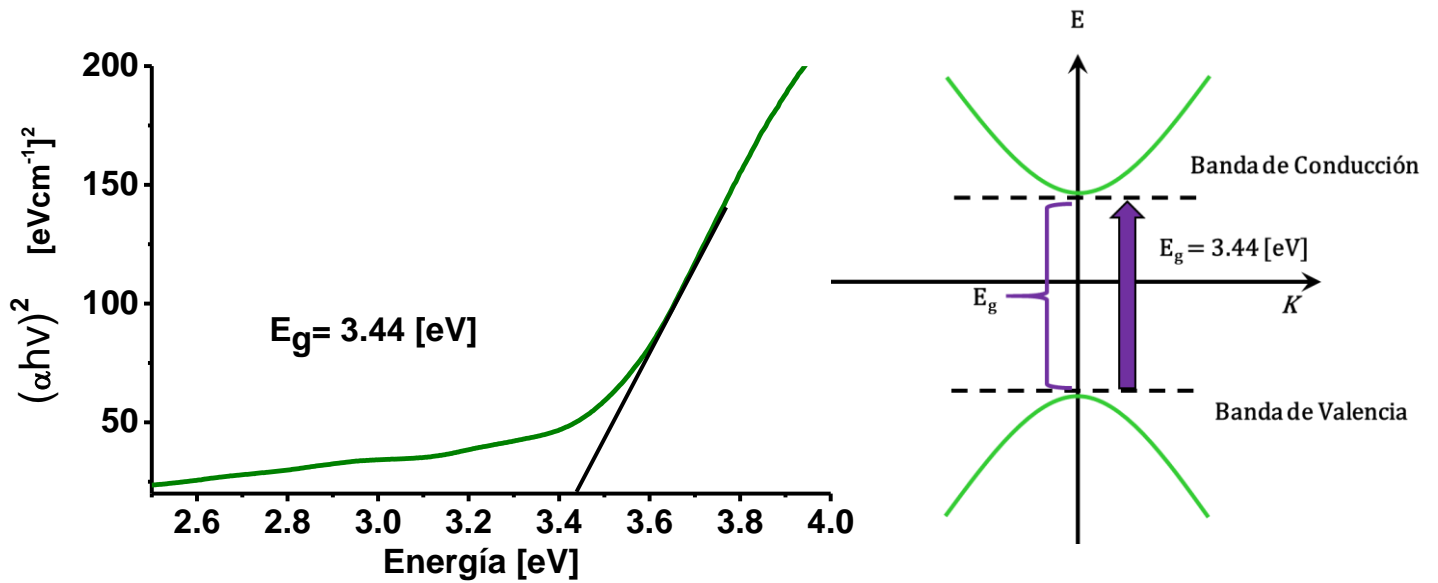
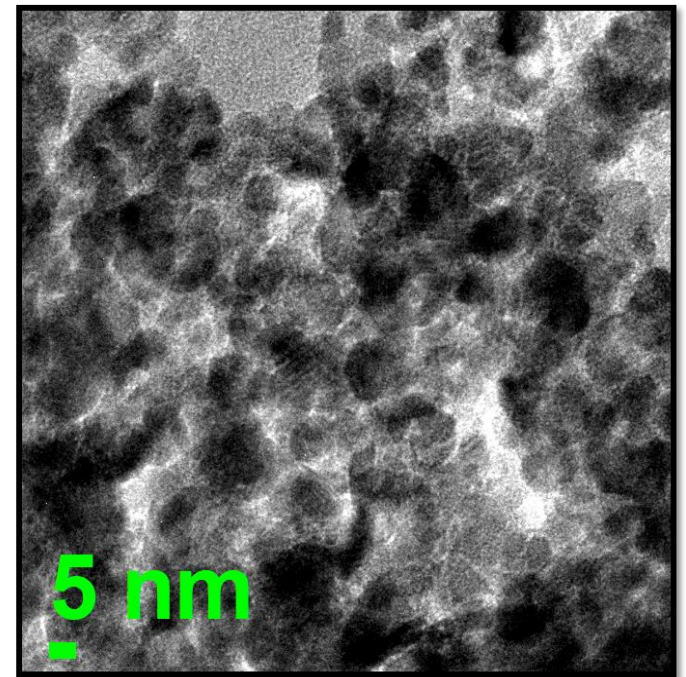
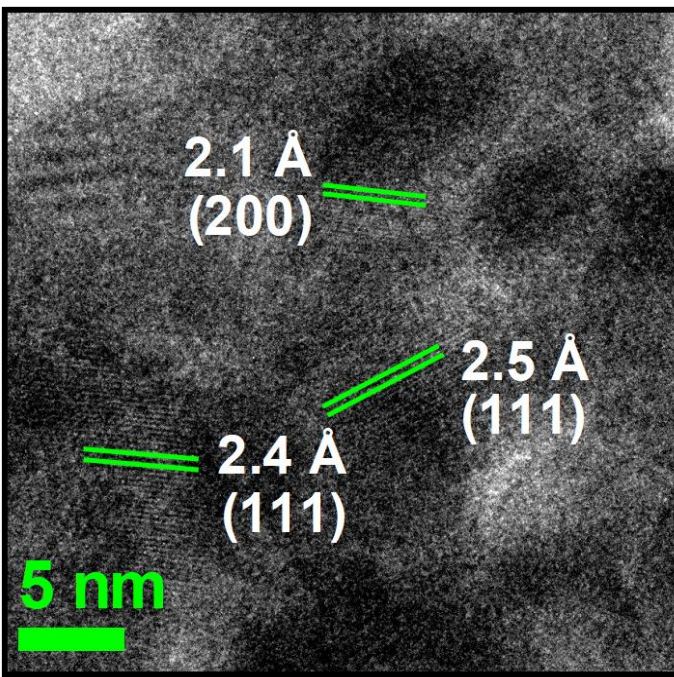
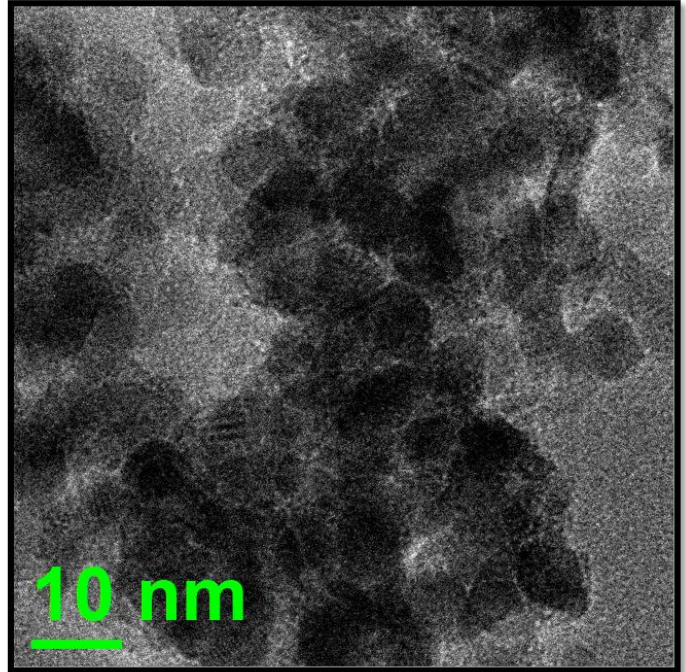
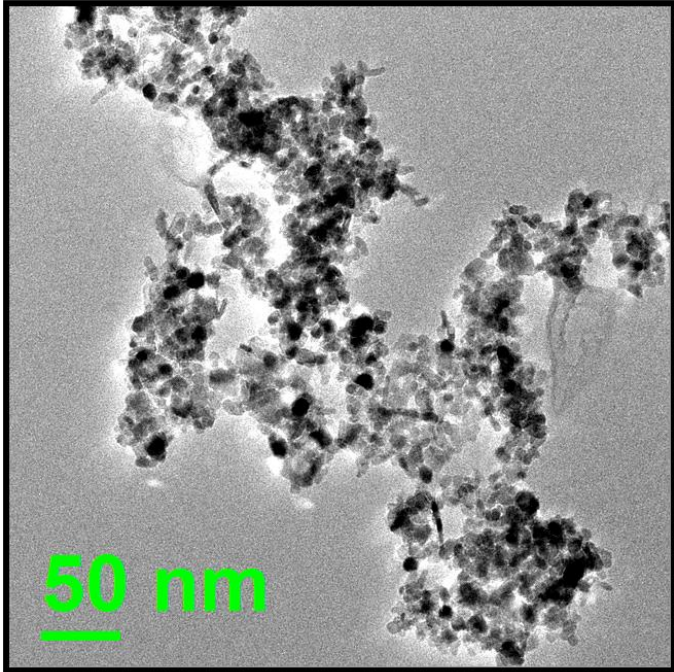


Figura 19. Gráfica de T_{auc} para el cálculo del valor de la energía de brecha prohibida para las NPs de NiO.

El valor obtenido es acorde a lo informado en la literatura para NPs de NiO [50]. El valor de la energía de brecha prohibida informado en la literatura para el NiO en bulto va de 3.4 eV a 4.3 eV, indicando que a pesar de la escala nanométrica del NiO obtenido, sus propiedades ópticas no se ven modificadas drásticamente.

❖ Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM)

Las NPs de NiO fueron estudiadas por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM). En la Figura 20 se presentan 4 micrográficas características de dichas NPs, con diferentes aumentos y su respectiva transformada de Fourier inversa.



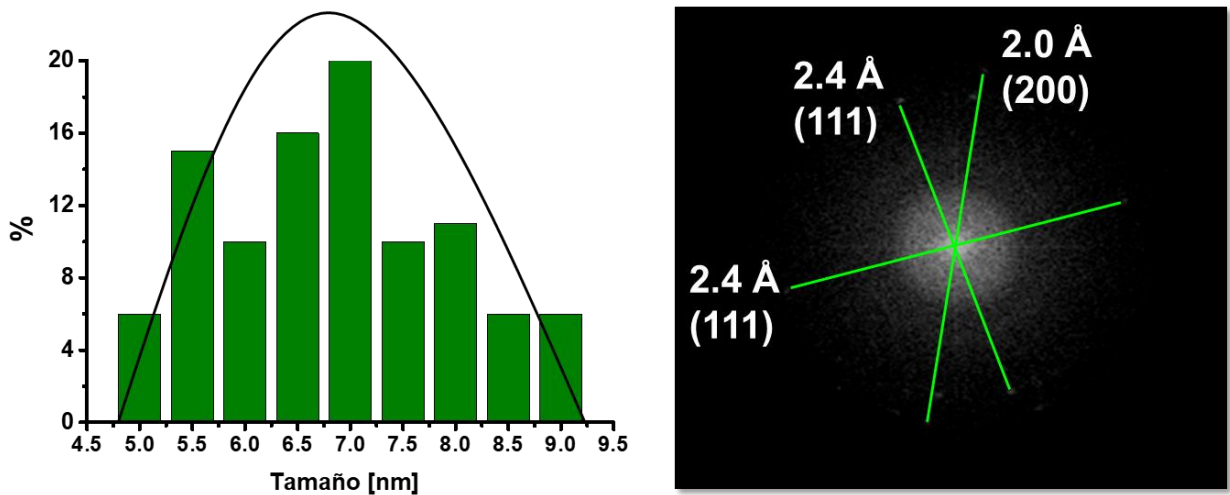


Figura 20. Micrografías de TEM de las NPs de NiO a diferentes aumentos, distancias interplanares, histograma de tamaños de NPs, y su respectiva transformada de Fourier inversa.

En las micrografías de las NPs de NiO, se puede observar que presentan morfologías semiesféricas con tamaños promedio de 7 ± 1.5 nm, lo que coincide con los que se determinaron a partir de su patrón de DRX. De manera general, se observa que las NPs de NiO obtenidas mediante un método mecanoquímico, tienen un tamaño con poca polidispersión y una morfología definida. Además, se observa que las distancias interplanares de las partículas, corresponden a planos cristalinos pertenecientes al NiO. Así mismo, la transformada inversa de Fourier corrobora la cristalinidad de las partículas, cuyas intensidades corresponden a los planos (111), y (200) con distancia interplanar de 2.4 Å y 2.0 Å respectivamente, para el NiO.

❖ Estudio del comportamiento magnético

Se llevó a cabo el estudio de magnetización (M) en función del campo magnético aplicado (H), a temperatura ambiente, de las NPs de NiO de 7 nm de diámetro. La respuesta obtenida se muestra en la Figura 21.

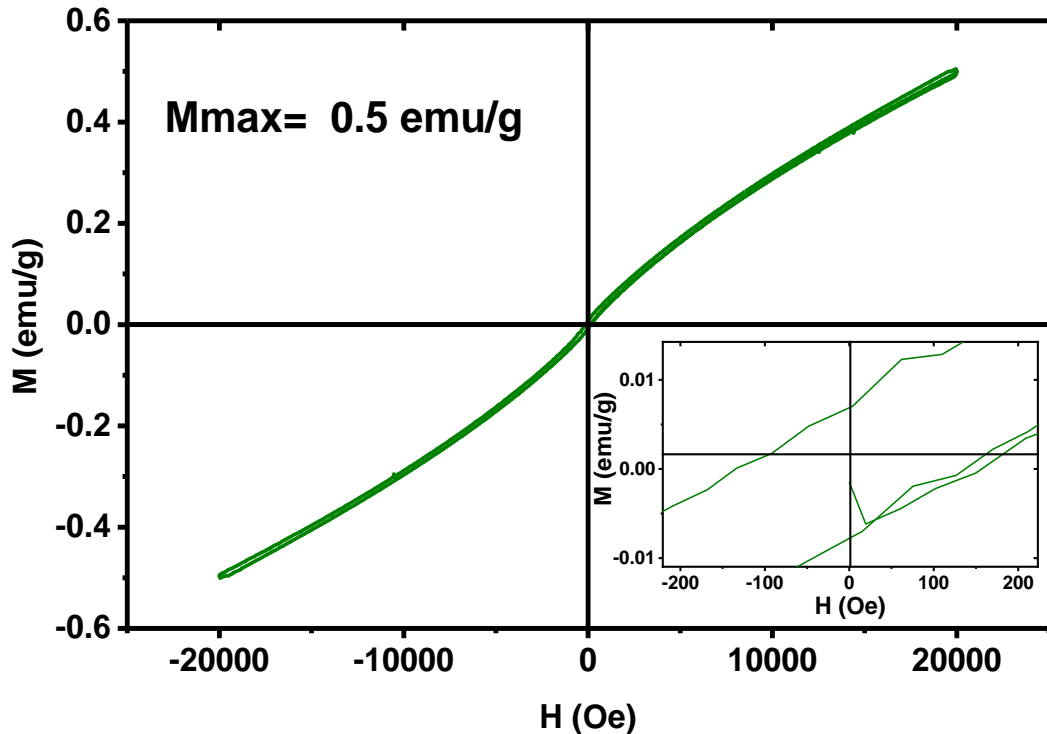


Figura 21. Curva de Magnetización de las NPs de NiO.

La curva observada muestra una débil respuesta magnética que sugiere un comportamiento paramagnético. En este caso, se tiene una magnetización máxima de 0.5 emu/g. Para un campo aplicado de 20000 Oe, el comportamiento paramagnético observado para las NPs de NiO, se debe a la gran cantidad de spines no alineados en la superficie de las NPs, mientras que en el *core* de las mismas los spines tienden a alinearse en dirección del campo magnético aplicado. Se ha informado que el NiO en bulto exhibe un comportamiento antiferromagnético [51].

8.2 Caracterización de las NPs de Fe_2O_3 .

❖ Difracción de Rayos X en polvo (DRX)

Las NPs de Fe_2O_3 obtenidas a partir de la metodología descrita en la sección 7, fueron caracterizadas por DRX. Como se observa en el difractograma que se

presenta en la Figura 22, todos los picos de difracción corresponden con los informados en la tarjeta cristalográfica (*International Centre for Diffraction Data*) ICDD 00-089-0599 para el Fe_2O_3 , en un sistema cristalino romboédrico, con un grupo espacial R-3c y parámetros de red $a = 5.032 \text{ \AA}$ y $c = 13.733 \text{ \AA}$. Este sistema se presenta como fase única.

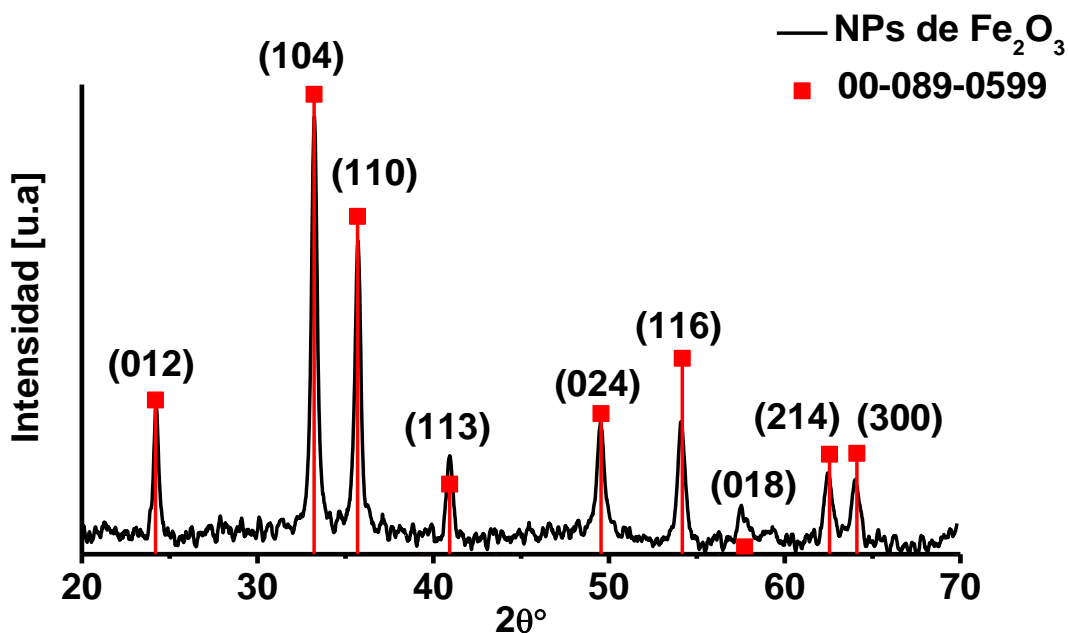


Figura 22. Difractograma de las NPs de Fe_2O_3 .

En la Tabla 6 se muestra la posición de cada pico de difracción y la distancia interplanar correspondiente.

Tabla 6. Posición de los picos de difracción $2\theta^\circ$ presentes en los patrones de DRX en polvo de las NPs de Fe_2O_3 .

Reflexión	Tarjeta cristalográfica 00-089-0599		NPs de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$
	d [Å]	$2\theta^\circ$	$2\theta^\circ$
(012)	3.6793	24.19	24.22
(104)	2.6968	33.22	33.22
(110)	2.5160	35.69	35.70
(113)	2.2049	40.93	40.94

(024)	1.8397	49.55	49.51
(116)	1.6930	54.17	54.11
(018)	1.5971	57.72	57.54
(214)	1.4850	62.55	62.51
(300)	1.4526	64.11	64.02

Se calculó el diámetro promedio de cristalito de las NPs de Fe₂O₃, a partir del ancho medio de cada uno de los picos de difracción, empleando la ecuación de *Scherrer* (Ver Ecuación 1). El tamaño promedio obtenido fue de 22 ± 6 nm.

❖ Espectroscopia Raman

De acuerdo al grupo de simetría, R-3c, la teoría de grupos predice los siguientes modos vibracionales para el Fe₂O₃:

$$\Gamma_{\text{opt}} = 2A_{1g} + 2A_{1u} + 3A_{2g} + 2A_{2u} + 5E_g + 4E_u$$

De los cuales 6 son activos en IR (2A_{2u} + 4E_u) y 7 en Raman (2A_{1g} + 5E_g).

Teniendo en cuenta lo anterior, las NPs de Fe₂O₃ fueron caracterizadas por espectroscopia de dispersión Raman, y su correspondiente espectro Raman se presenta en la Figura 23. En el cual, se observan 6 señales principales en la región de 200 a 1400 cm⁻¹. Las señales con un máximo en 227 y 497 cm⁻¹, se asignan a los dos modos A_{1g}, las señales con un máximo en 293, 405, y 609 cm⁻¹ corresponden a los cinco modos E_g, y la banda con un máximo en 1308 cm⁻¹ se asigna a la dispersión de dos magnones (2M) en la hematita. Este espectro es característico de NPs de Fe₂O₃ y coincide con lo informado por otros grupos de investigación [52].

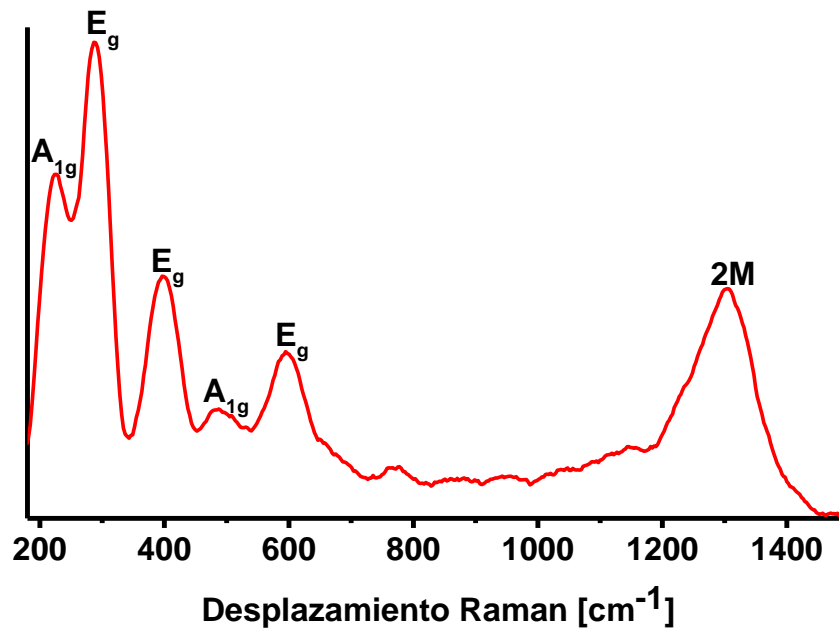


Figura 23. Espectro Raman de las NPs de Fe₂O₃.

❖ Espectroscopia FTIR

Las NPs de Fe₂O₃, fueron caracterizadas por espectroscopia FTIR, obteniéndose el espectro que se muestra en la Figura 24. En el espectro FTIR de las NPs de Fe₂O₃, se observan dos señales por debajo de 1000 cm⁻¹ características de α -Fe₂O₃. La banda en 554 cm⁻¹ se asignó a la vibración Fe-O en los sitios octaédricos y tetraédricos, y la banda en 471 cm⁻¹ se asignó a la vibración Fe-O en el sitio octaédrico de la hematita, lo que coincide con lo informado en la literatura [53]. En este espectro no se observan bandas intensas debido a la absorción de agua.

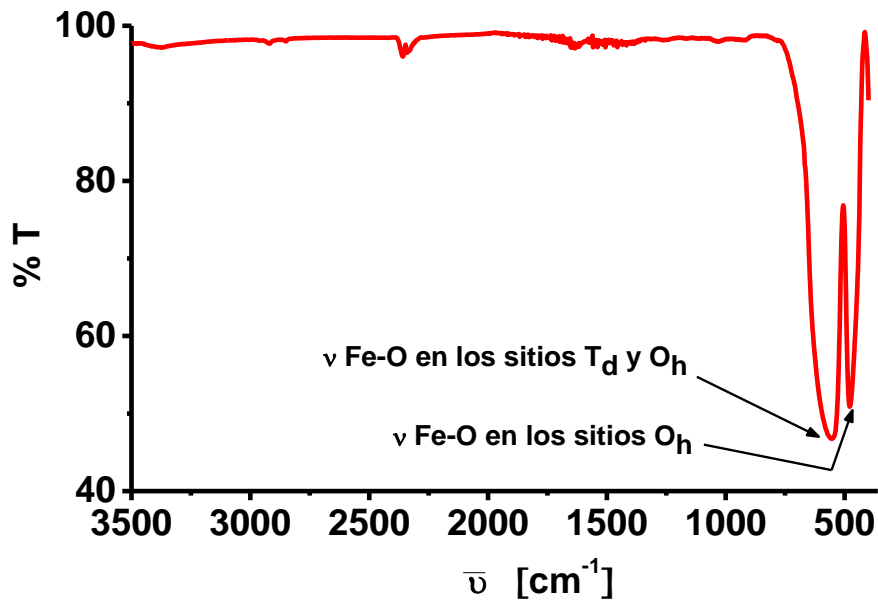


Figura 24. Espectro FTIR de las NPs de Fe₂O₃.

❖ **Espectroscopia de absorción electrónica UV-Visible.**

El espectro de absorción electrónica en la región UV-Vis, en polvo, empleando la técnica de reflectancia difusa se presenta en la Figura 25.

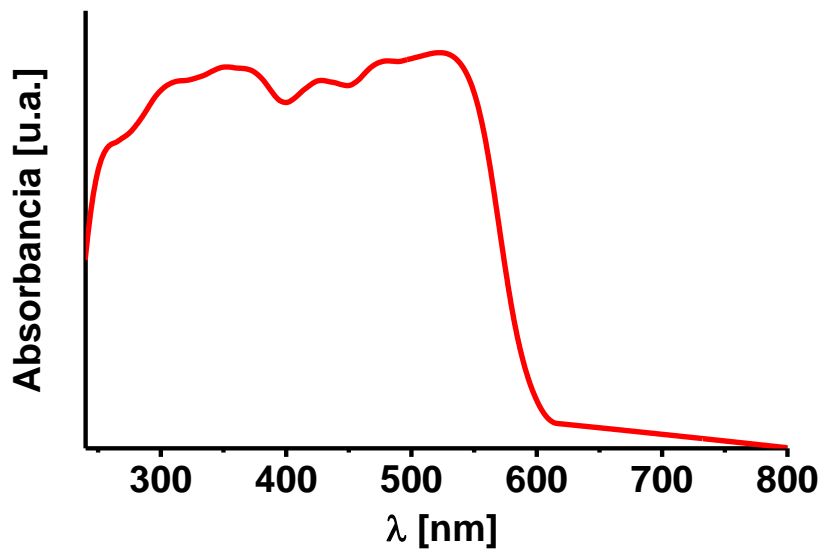


Figura 25. Espectro de absorción electrónica UV-Vis de las NPs de Fe₂O₃.

En el anterior espectro se observa una banda ancha que absorbe de 350 a 690 nm, que puede ser la envolvente de las 350 nm asignada a las transiciones ${}^6A_1 \rightarrow {}^4T_1$ (4P) y ${}^6A_1 \rightarrow {}^4T_2$, observadas alrededor de los 350 nm, y una segunda región de alrededor de los 540 nm en donde se esperan las transiciones ${}^6A_1 \rightarrow {}^4T_1$ (4G) traslapada con ${}^6A_1 \rightarrow {}^4E_1$, 4A_1 (4G), de acuerdo con lo informado en la literatura [54]. A partir del modelo de *Tauc* que se describió anteriormente con la Ecuación 2, se calculó el valor de la energía de brecha prohibida de las NPs de Fe_2O_3 , como se observa en la Figura 26.

Obteniéndose un valor de 2.1 eV, para una transición directa, valor que se encuentra acorde con lo informado en la literatura para NPs de Fe_2O_3 [54].

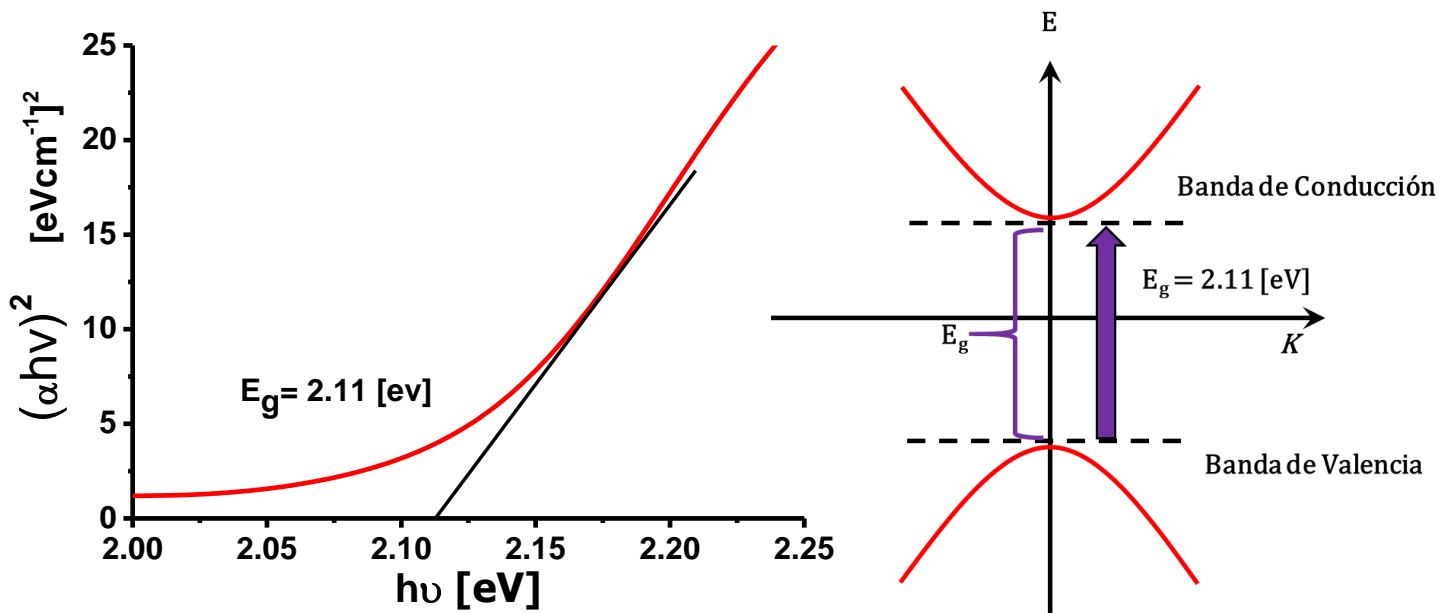


Figura 26. Gráfico de *Tauc* para el cálculo del valor de la energía de brecha prohibida de las NPs de Fe_2O_3 .

❖ **Microscopía electrónica de Trasmisión (TEM) de las NPs de Fe_2O_3 .**

Las NPs de Fe_2O_3 fueron estudiadas por microscopia electrónica de trasmisión de alta resolución (HR-TEM). En la Figura 27 se presentan 3 micrografías

características de dichas NPs, con diferentes aumentos y su respectiva transformada de Fourier inversa.

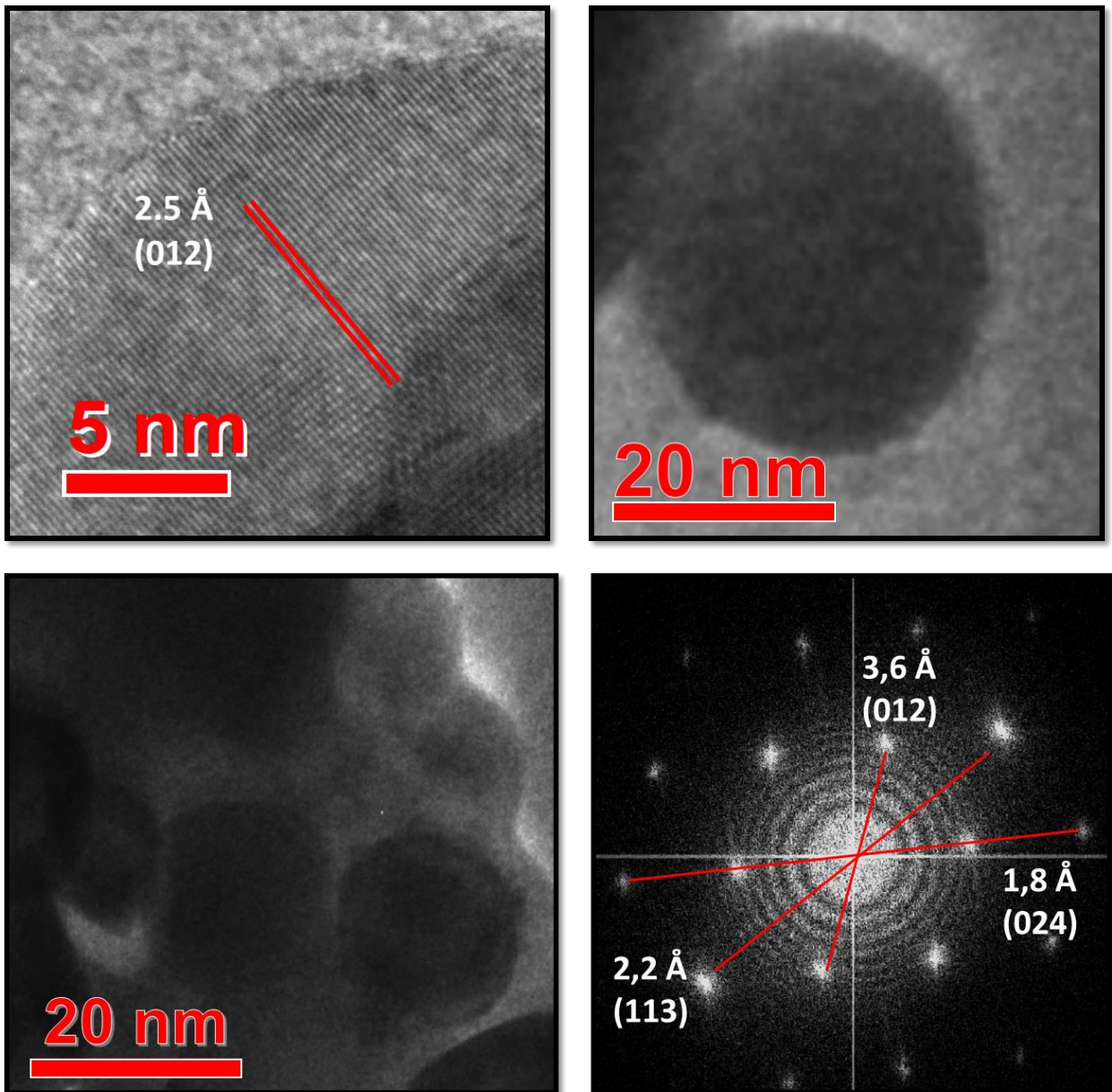


Figura 27. Micrografías TEM de las NPs de Fe_2O_3 a diferentes aumentos, sus tamaños de nanopartícula, distancias interplanares, y su respectiva transformada de Fourier inversa.

En las micrografías de las NPs de Fe_2O_3 , se puede observar que presentan morfologías semiesféricas con tamaños promedio de 22 ± 15 nm, lo que coincide con los que se determinaron a partir de su patrón de DRX. De manera general, se observa que las NPs de Fe_2O_3 obtenidas mediante un método mecanoquímico, tienen un tamaño con poca polidispersión y una morfología definida. Además, se observa que las distancias interplanares de las partículas, corresponden a planos cristalinos pertenecientes al Fe_2O_3 . Así mismo, la transformada inversa de Fourier corrobora la cristalinidad de las partículas, cuyas intensidades corresponden al plano (012) con distancia interplanar de 3.6 Å, (024) con distancia interplanar de 1.8 Å, y (113) con distancia interplanar de 2.2 Å, de la Fe_2O_3 .

❖ Estudio del comportamiento magnético

Se llevó a cabo el estudio de magnetización (M) en función del campo magnético aplicado (H), a temperatura ambiente, de las NPs de Fe_2O_3 de 22 nm de diámetro. La respuesta obtenida se muestra en la Figura 28.

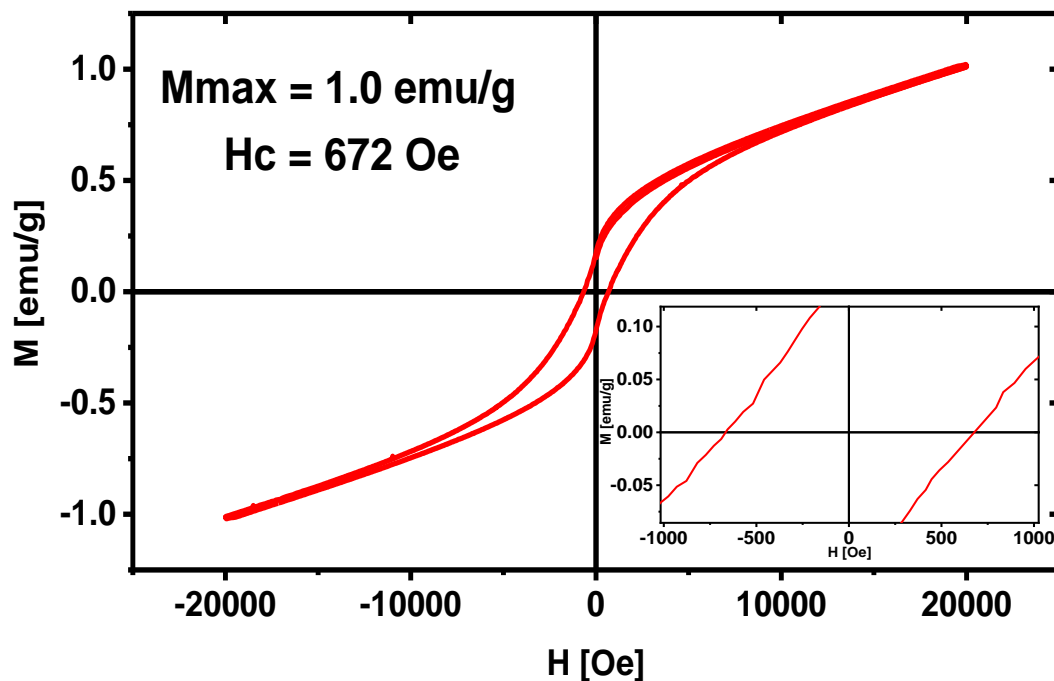


Figura 28. Curva de Magnetización de las NPs de Fe_2O_3 .

La respuesta observada muestra un comportamiento claramente ferrimagnético (que no alcanza la saturación), con un valor bajo de magnetización máxima (1.0 emu/g), atribuible al ordenamiento de espines en la estructura cristalina de la hematita. El valor de campo coercitivo (H_c) obtenido fue de 672 Oe, el cual puede asociarse a la anisotropía magnetocristalina, y al tamaño de las NPs (que puede favorecer mecanismos de rotación, lo cual a su vez facilita campos coercitivos altos). Se ha informado que la hematita en bulto, es débilmente ferromagnética a T°_{amb} , y experimenta una transición de fase a 260 K (temperatura de Morin, T_M) a un estado antiferromagnético [55].

8.3 Caracterización de las NPs de $NiFe_2O_4$.

❖ Difracción de Rayos X en polvo (DRX)

Las NPs de $NiFe_2O_4$ obtenidas fueron caracterizadas mediante DRX obteniéndose el difractograma que se presenta en la Figura 29, adicionalmente, se presentan los picos informados en la tarjeta cristalográfica (*International Centre for Diffraction Data*) ICDD 00-086-2267 para la $NiFe_2O_4$, en un sistema cristalino cúbico, con un grupo espacial $Fd-3m$ y parámetros de red $a = b = c = 8.337 \text{ \AA}$.

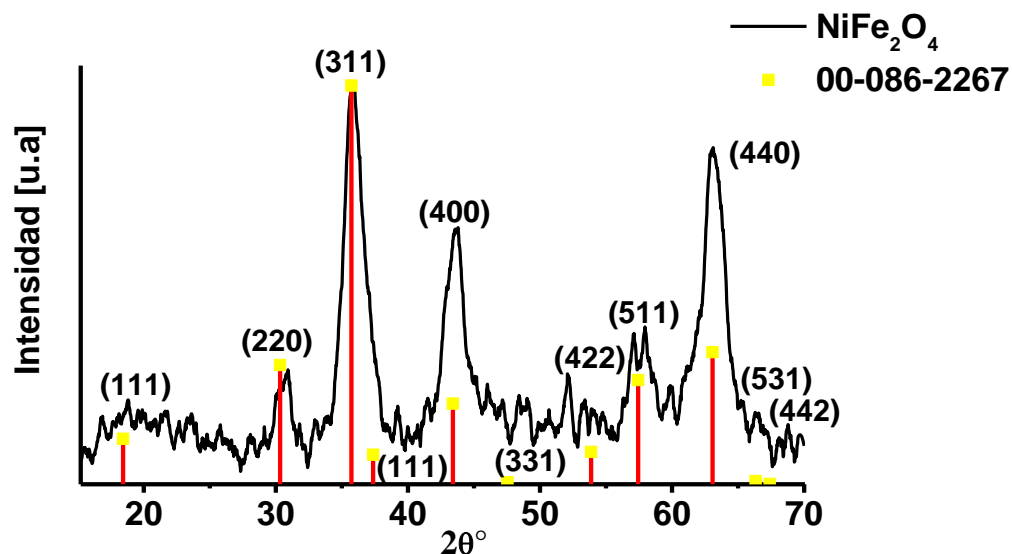


Figura 29. Difractograma de las NPs de $NiFe_2O_4$.

De acuerdo al difractograma obtenido todas las señales corresponden con los picos de difracción informados en la tarjeta cristalográfica, indicando que se obtuvo la espinela inversa NiFe_2O_4 , como fase única.

En la Tabla 7 se muestra las señales correspondientes a cada reflexión con su respectiva distancia interplanar.

Tabla 7. Posición de los picos de difracción $2\theta^\circ$ presentes en los patrones de DRX en polvo de las NPs de NiFe_2O_4 .

Reflexión	Tarjeta cristalográfica 00-086-2267		NPs de NiFe_2O_4
	d [Å]	$2\theta^\circ$	$2\theta^\circ$
(111)	4.8133	18.43	18.77
(220)	2.9475	30.32	30.78
(311)	2.5137	35.72	35.91
(222)	2.4066	37.37	37.54
(400)	2.0842	43.42	43.66
(331)	1.9126	47.54	48.67
(422)	1.7017	53.87	53.29
(511)	1.6044	57.44	57.43
(440)	1.4737	63.08	63.05
(531)	1.4092	66.33	66.43
(442)	1.3895	67.40	67.19

A partir del difractograma obtenido para las NPs de NiFe_2O_4 , y considerando los picos correspondientes a las reflexiones de los planos (311), (400), y (440), se calculó el diámetro promedio de cristalito, a partir de la ecuación de *Scherrer* (Ver Ecuación 1), obteniéndose un tamaño promedio de cristalito para las NPs de NiFe_2O_4 de 5 ± 0.4 nm.

❖ Espectroscopia Raman

De acuerdo al grupo de simetría, $Fd-3m$, la teoría predice los siguientes modos vibracionales para el $NiFe_2O_4$:

$$\Gamma_{opt} = A_{1g} + E_g + T_{1g} + 3T_{2g} + 2A_{2u} + 2E_u + 5T_{1u} + 2T_{2u}$$

De los cuales, 5 son activos en IR ($5T_{1u}$) y 5 en Raman ($A_{1g} + E_g + 3T_{2g}$).

Teniendo en cuenta lo anterior, las NPs de $NiFe_2O_4$ obtenidas fueron caracterizadas mediante espectroscopia Raman, obteniéndose el espectro que muestra la Figura 30.

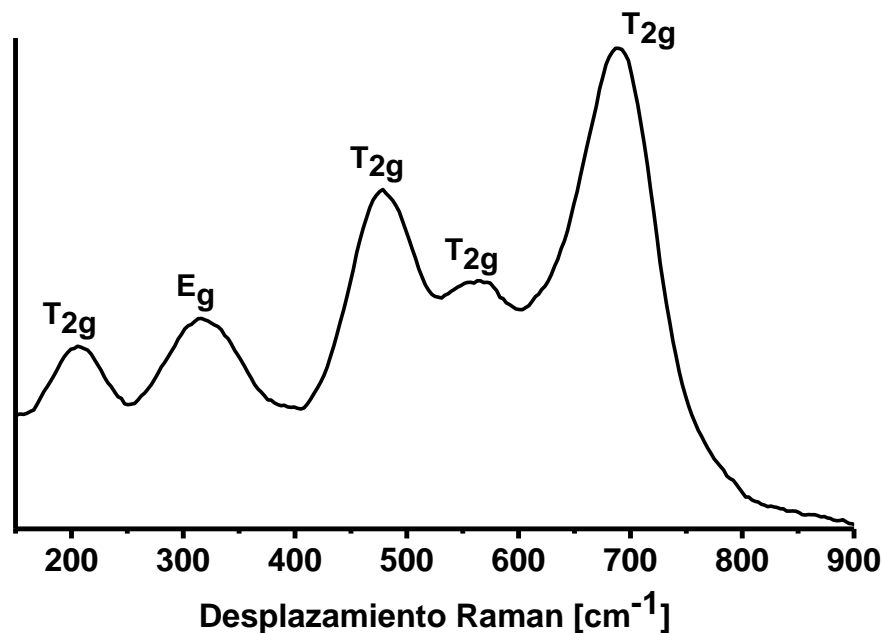


Figura 30. Espectro Raman para las NPs de $NiFe_2O_4$.

Las señales observadas en el espectro anterior, con máximos en 206, 478 y 567 cm^{-1} fueron asignadas a los tres modos vibracionales con simetría T_{2g} , y las señales en 317 y 689 cm^{-1} , se asignaron a los modos vibracionales con simetría E_g y A_{1g} , respectivamente. Esto coincide con los modos vibracionales activos en Raman y con lo informado en la literatura [56].

❖ Espectroscopia FTIR

Las NPs de NiFe_2O_4 obtenidas, fueron caracterizadas por espectroscopia FTIR obteniéndose el espectro que se muestra en la Figura 31.

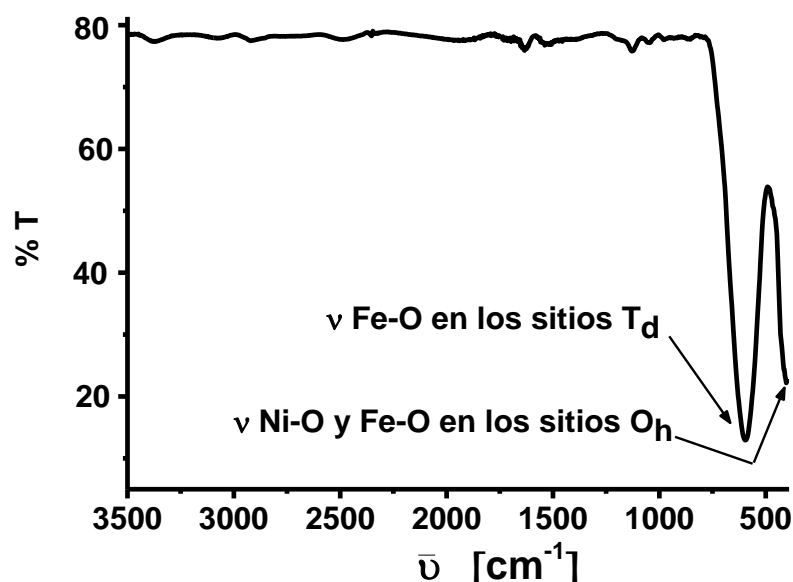


Figura 31. Espectro FTIR para las NPs de NiFe_2O_4 .

En el espectro anterior, se observan dos señales características, una en 596 cm^{-1} asignada al estiramiento del enlace Fe-O en los sitios tetraédricos y otra en 404 cm^{-1} asignada a las vibraciones Ni-O y Fe-O de los sitios octaédricos, estas señales fueron asignadas de acuerdo con lo informado en la literatura [57]. En este espectro no se observan bandas intensas debido a la absorción de agua.

❖ Espectroscopia UV-Vis

Las NPs de NiFe_2O_4 fueron caracterizadas por espectroscopia de absorción electrónica en la región UV-Vis, empleando la técnica de reflectancia difusa. En la Figura 32 se muestra el espectro de absorción de dichas NPs.

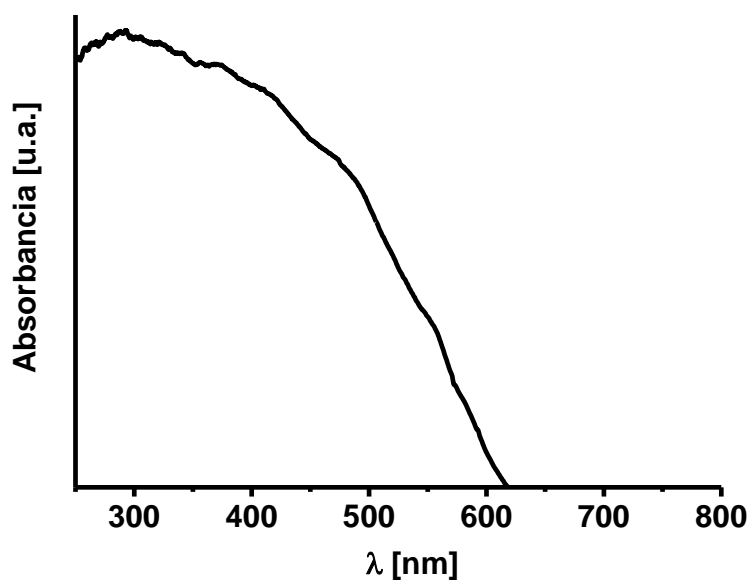


Figura 32. Espectro de absorción UV-Vis de las NPs de NiFe₂O₄.

En el anterior espectro, se observa una banda de absorción intensa en la región de 250–600 nm, con un borde de absorción relativamente pronunciado correspondiente a la energía de la brecha prohibida. Para la NiFe₂O₄ en bulto el máximo se encuentra alrededor de los 385 nm, con un valor de banda prohibida de 0.8 [eV] [58], indicando que a los tamaños nanométricos de las NPs de NiFe₂O₄ obtenidas, existe un corrimiento hacia el azul en su absorción. En este tipo de espinelas se considera que el orbital O_{2p} forma la banda de valencia (BV) y el orbital híbrido Fe_{3d}, la banda de conducción (BC) [59]. Empleando el modelo de *Tauc*, (Ver Ecuación 2), se determinó el valor de la energía de la brecha prohibida de las NPs de NiFe₂O₄, como se observa en la Figura 33, obteniéndose un valor de 1.55 eV el cual coincide con lo informado en la literatura para NPs de NiFe₂O₄ [59].

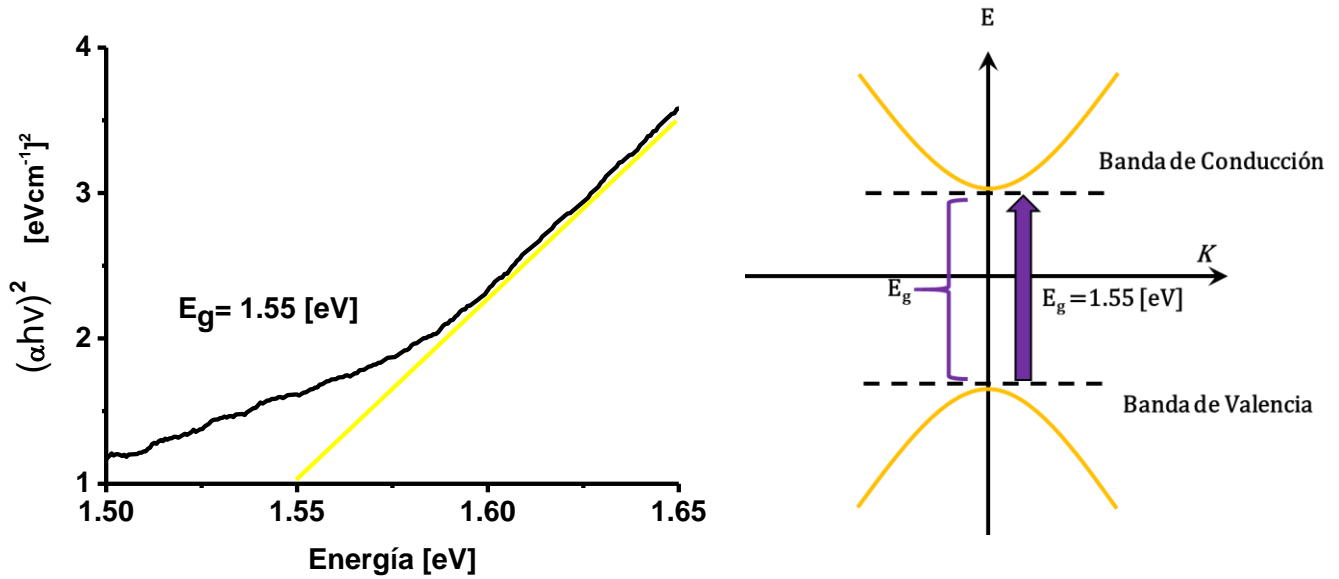


Figura 33. Gráfico de $Tauc$ para el cálculo del valor de la energía de brecha prohibida de las NPs de NiFe_2O_4 .

❖ **Microscopía electrónica de Trasmisión (TEM) de las NPs de NiFe_2O_4 .**

Las NPs de NiFe_2O_4 fueron estudiadas por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM). En la Figura 34 se presentan 4 micrografías características de dichas NPs, con diferentes aumentos y su respectiva transformada de Fourier inversa.

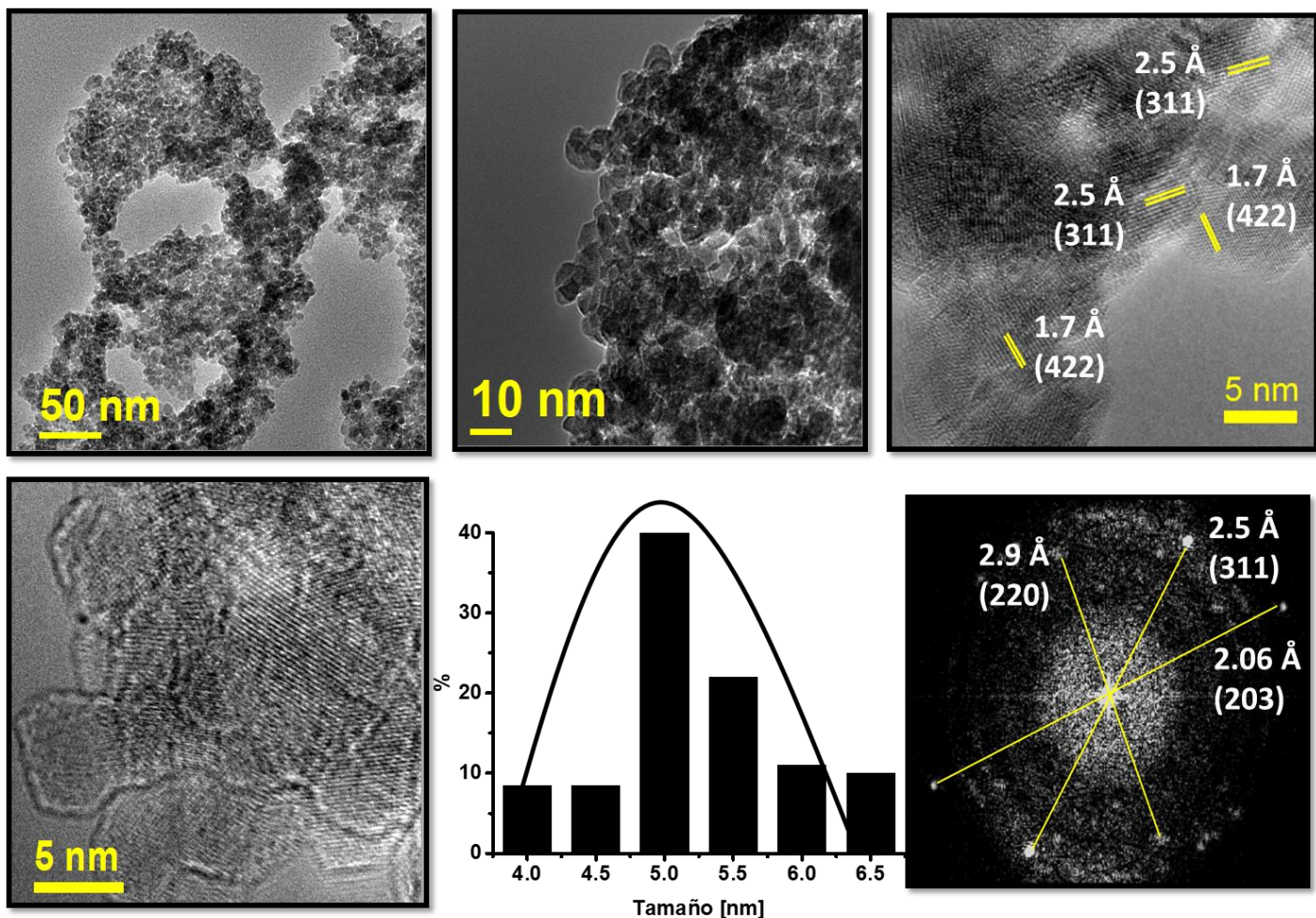


Figura 34. Micrografías TEM de las NPs de NiFe₂O₄ a diferentes aumentos, distancias interplanares, histograma de tamaños de NPs, y su respectiva transformada de Fourier inversa.

En las micrografías de las NPs de NiFe₂O₄, se puede observar que presentan morfologías esféricas con tamaños promedio de 5 ± 1.5 nm, lo que coincide con el que se determinó a partir de su patrón de DRX. De manera general, se observa que las NPs de NiFe₂O₄ obtenidas mediante un método mecanoquímico, tienen un tamaño con poca polidispersión y una morfología definida. Además, se observa que las distancias interplanares de las nanopartículas, corresponden a planos cristalinos pertenecientes a la NiFe₂O₄. Así mismo, la transformada de Fourier inversa corrobora la cristalinidad de las partículas, los puntos más intensos corresponden al

plano (311) con distancia interplanar de 2.5 Å, (203) con distancia interplanar de 2.06 Å, y, (220) con distancia interplanar de 2.9 Å, para la NiFe₂O₄.

❖ Estudio del comportamiento magnético

Se llevó a cabo el estudio de magnetización (M) en función del campo magnético aplicado (H), a temperatura ambiente, de las NPs de NiFe₂O₄ de 5 nm de diámetro. La respuesta obtenida se muestra en la Figura 35.

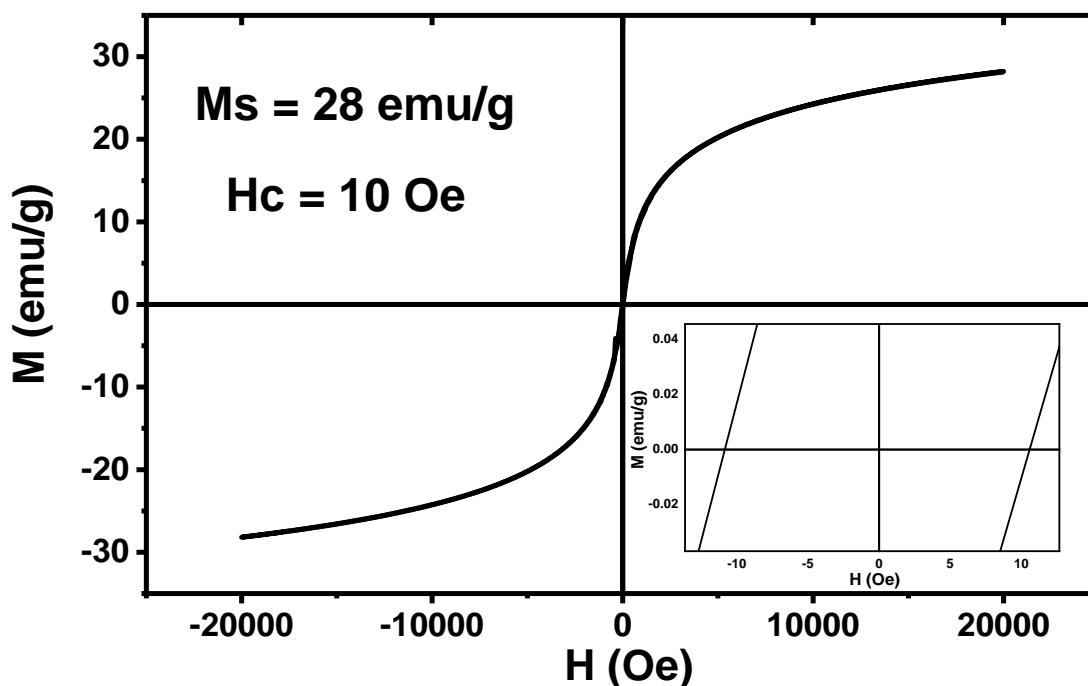



Figura 35. Curva de Magnetización de las NPs de NiFe₂O₄.

La respuesta observada muestra un comportamiento muy cercano al estado “superparamagnético” en el cual, la magnetización de cada partícula está saturada, pero la interacción entre partículas es muy débil. Presenta un campo coercitivo bajo de 10 Oe, y una magnetización de saturación máxima, $M_s = 28$ emu/g [60].

De acuerdo con los resultados presentados en las secciones 8.1, 8.2, y 8.3, en la presente investigación se obtuvieron NPs de: NiO de 7 ± 1 nm paramagnéticas, α -Fe₂O₃ de 22 ± 10 nm ferrimagnéticas, y, NiFe₂O₄ de 5 ± 1 nm “superparamagnéticas”,



mediante mecnosíntesis. Todas las NPs fueron obtenidas como fases únicas. Las técnicas espectroscópicas junto a las micrograffías TEM confirmaron la efectiva formación de las NPs mencionadas. Una vez sintetizadas y caracterizadas dichas NPs, se evaluó la actividad antimicrobiana de éstas frente a una cepa Gram positiva: *S. aureus*, y una cepa Gram negativa: *P. aeruginosa*. Los resultados de las pruebas microbicidas se presentan a continuación.

8.4 Resultados de las pruebas de susceptibilidad bacteriana para *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

- *Ensayo 1.)* Prueba de susceptibilidad bacteriana en TSB.

Los resultados para cada uno de los sistemas de NPs en la prueba de susceptibilidad bacteriana en TSB, se obtuvieron teniendo en cuenta la absorción de los pozos a una $\lambda = 595$ nm (valor estándar para bacterias), en esta prueba la intensidad de absorción es directamente proporcional a la cantidad de células bacterianas presentes. En las Figura 36 y 37, se presentan las gráficas de absorción vs concentración de NPs, obtenidas después de tres días de incubación, para *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente. En dichas gráficas, se presentan los resultados para los tres sistemas estudiados, así como los controles: negativo (CN- = Bacteria + Amoxicilina) y positivo (CP+ = Bacteria + TSB), además se presenta la significancia (representada por (*)), siendo * = significativo, en un nivel de confianza del 95%, obtenido de la prueba de Tukey mediante el Software GrahPad Prism 8), respecto al control positivo.

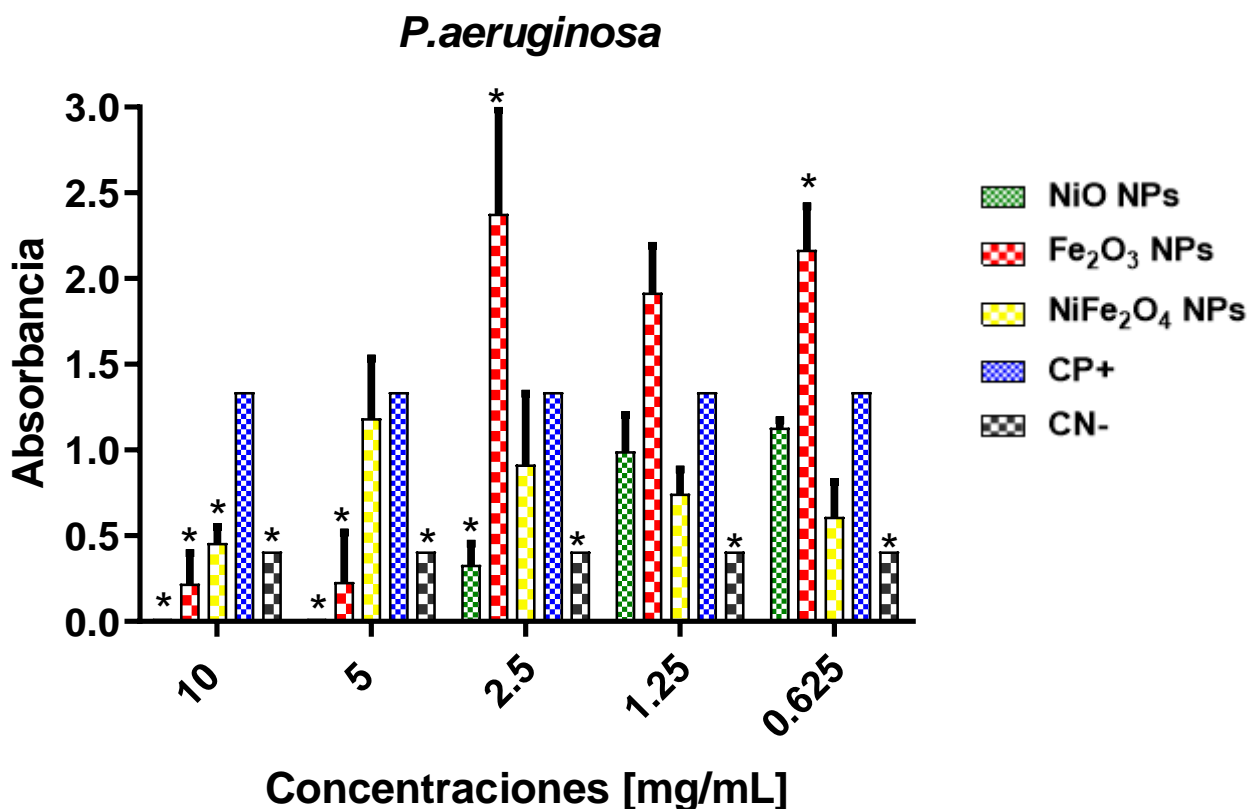


Figura 36. Gráfica de absorbancia vs concentración, obtenida de las placas de 96 pozos en TSB a una $\lambda = 595$ nm, para *P. aeruginosa*

En la gráfica de la Figura 36, para *P. aeruginosa* se observa una inhibición significativa de crecimiento bacteriano (respecto al CP+) a las concentraciones de:

- ✓ 10,5, y, 2.5 mg/mL para las NPs de NiO,
- ✓ 10,y 5 mg/mL para las NPs de Fe₂O₃
- ✓ 10 mg/mL, 1.25 mg/mL y 0.625 mg/mL para las NPs de NiFe₂O₄,

En este caso las NPs de Fe₂O₃ presentan un comportamiento muy particular, ya que a partir de una concentración de 2.5 mg/m de dichas NPs, el crecimiento de *P. aeruginosa* aumenta significativamente. Este comportamiento puede atribuirse a que, bajo algunas condiciones de concentración y tamaños de partícula, el hierro presente en las NPs de hematita puede jugar un papel nutritivo en el crecimiento bacteriano, proporcionando una fuente de hierro biodisponible [61]. Por otro lado,

aunque el efecto de las NPs de la ferrita de níquel no es tan significativo, se observa una mayor inhibición del crecimiento bacteriano a la mayor concentración de NPs, así como a las dos menores. Este comportamiento puede estar relacionado con la dispersión de las NPs en el medio, lo que significaría que, a menor concentración de las NPs, la dispersión de éstas se favorece generando una inhibición más efectiva sobre el crecimiento bacteriano.

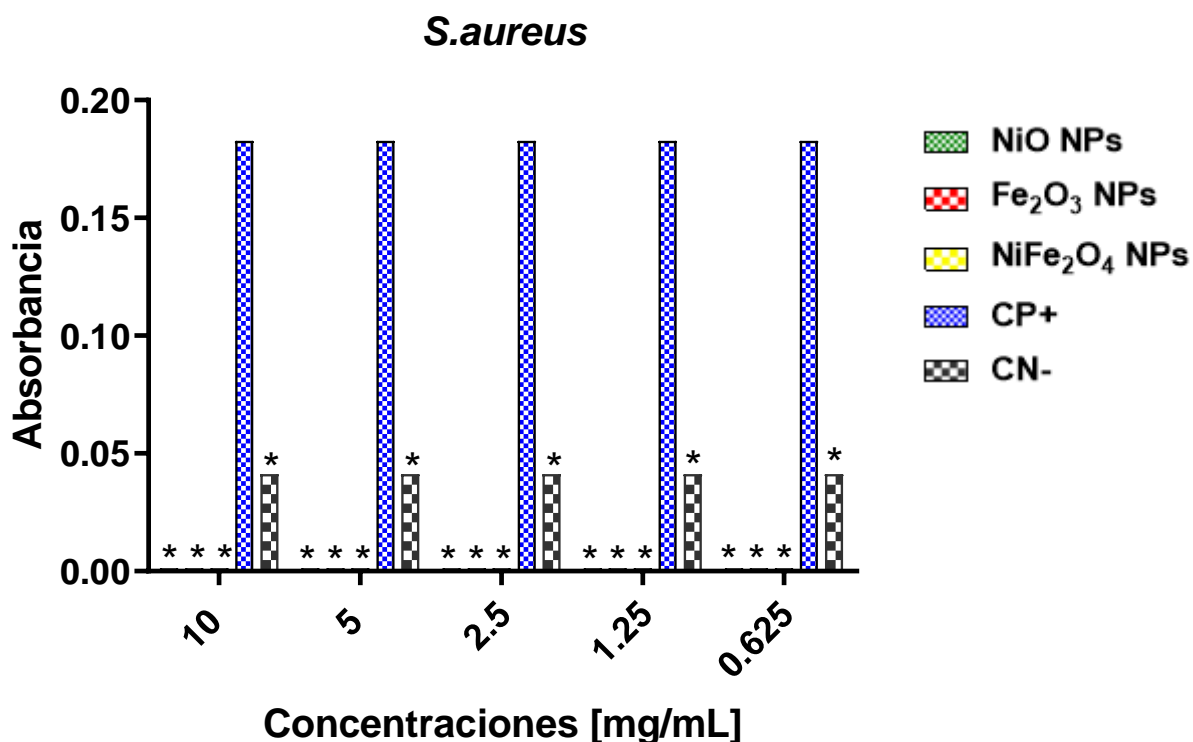



Figura 37. Gráfica de absorbancia vs concentración, obtenida de las placas de 96 pozos en TSB a una $\lambda = 595$ nm, para *S. aureus*.

En la Figura 37 se observa que los tres sistemas de NPs estudiados en esta tesis, generan una inhibición del crecimiento de *S. aureus*, prácticamente del 100%, en todas las concentraciones de NPs evaluadas. Este resultado sugiere un mejor efecto de las nanopartículas de NiO, Fe₂O₃ y de NiFe₂O₄, para las bacterias Grampositivas, respecto a las Gramnegativas.



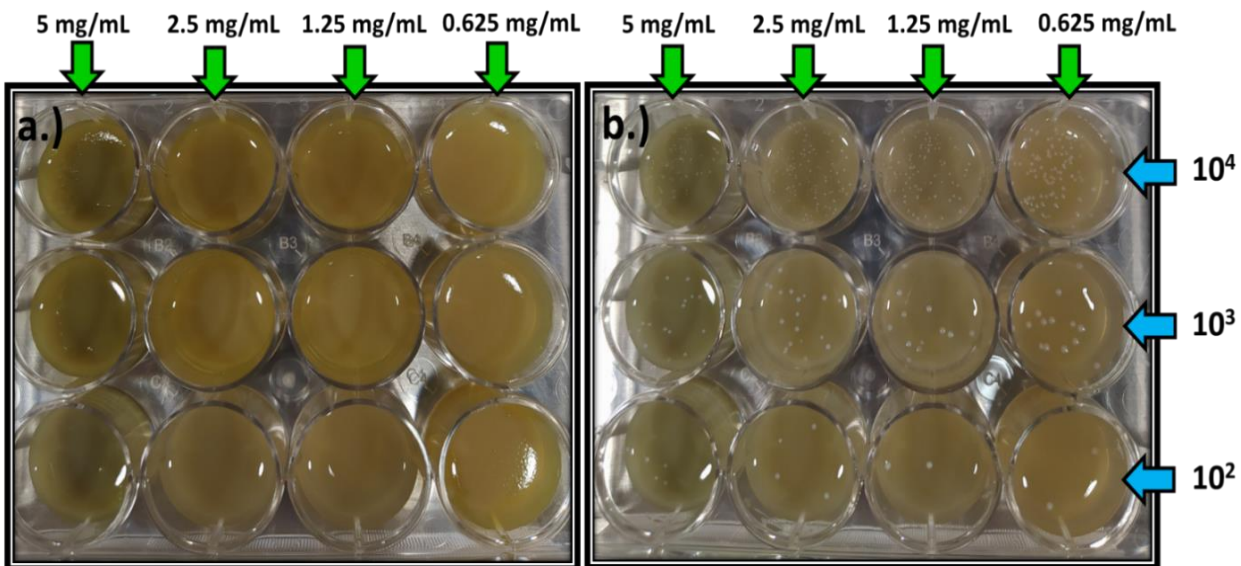
Aunque los resultados previamente discutidos muestran una inhibición del crecimiento bacteriano, en presencia de las NPs, es importante considerar que la evaluación de la actividad antimicrobiana bajo estos protocolos normalmente estudia sistemas solubles en agua, y que no absorben en la región visible. Por consiguiente, este experimento no es el más adecuado para evaluar NPs de óxidos metálicos.

Por consiguiente, se decide probar la efectividad antibacteriana de las NPs mediante ensayos en los que se pueda evaluar a las NPs de óxidos metálicos en contacto más cercano con las cepas bacterianas evaluadas. Como se presenta en a continuación, en los siguientes ensayos.

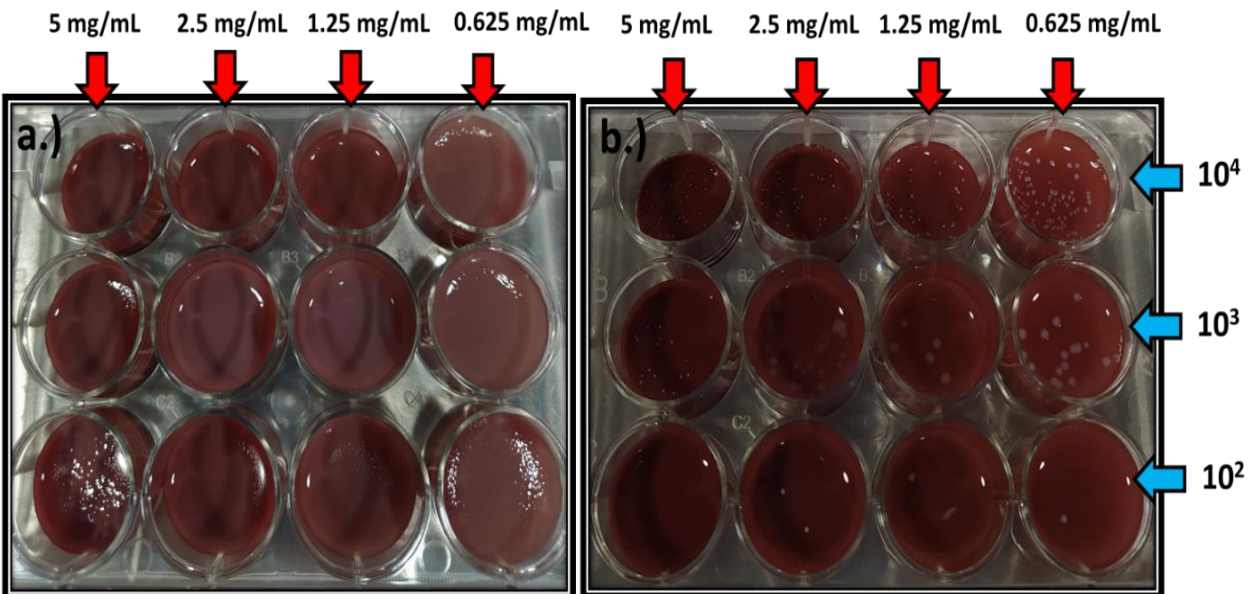
- *Ensayo 2.)* Prueba de susceptibilidad bacteriana en TSA.

Los resultados obtenidos en este experimento fueron evaluados a partir del conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC's) para cada pozo de la placa, sin embargo, para *P. aeruginosa* las UFC's fueron incontables debido a su crecimiento tipo "película", por lo tanto, se tuvo en cuenta el % del pozo en el cual no había crecimiento bacteriano. En la Figura 38 se muestran las fotografías de las placas después de 3 días de la interacción NPs-Bacteria, donde se observan las UFC's correspondientes a *S. aureus* y un crecimiento tipo "película" para *P. aeruginosa*. Con lo anterior, y teniendo en cuenta los CP+ de cada bacteria, se procede a calcular el porcentaje (%) de inhibición de crecimiento para cada pozo, de acuerdo al sistema y concentración de NPs, así como la dilución de bacteria empleada, como se presenta en la Tabla 8.

NPs de NiO en TSA



NPs de Fe₂O₃ en TSA



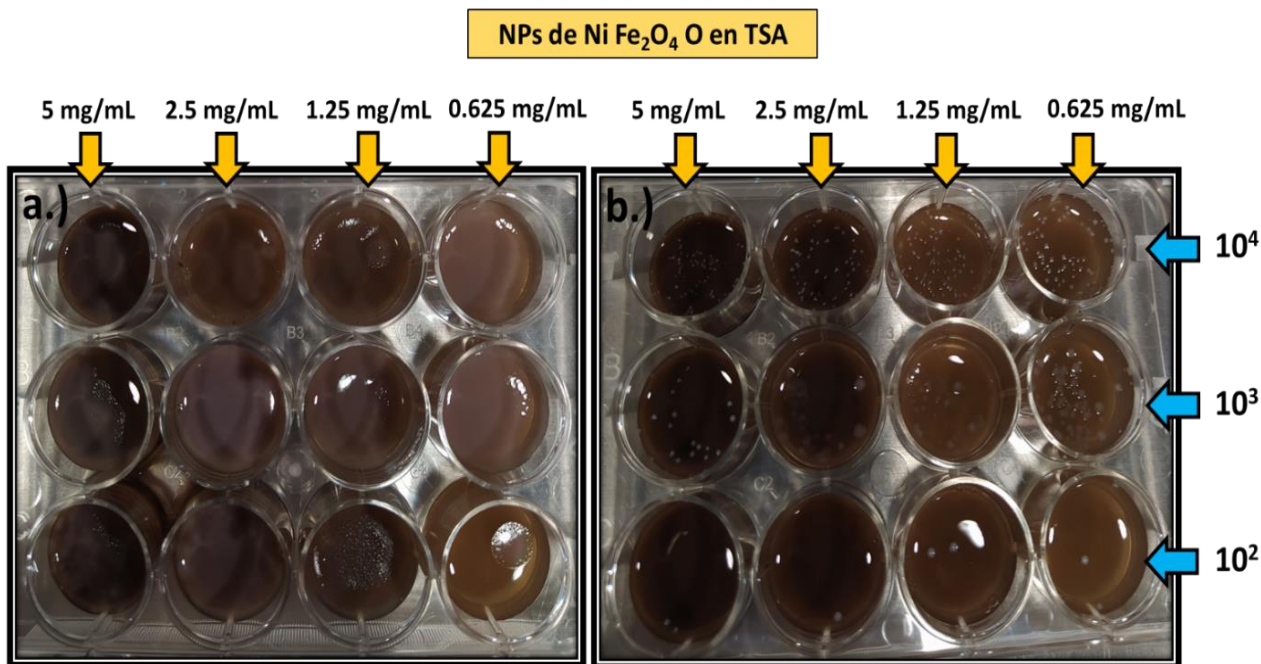


Figura 38. Fotografía de las placas de 12 pozos en TSA después de 3 días de interacción para: a.) *P. aeruginosa*, y b.) *S. aureus*. Los pozos se presentan en la misma disposición que se distribuyeron en la Figura 13.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de crecimiento para cada uno de los sistemas de NPs a sus respectivas concentraciones, dilución bacteriana, y para cada bacteria estudiada en TSA.

	NiO NPs			
Bacteria (<i>P. aeruginosa</i>)	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL
10^4	0%	0%	0%	0%
10^3	0%	0%	0%	0%
10^2	100%	100%	100%	20%

	Fe ₂ O ₃ NPs			
Bacteria (<i>P. aeruginosa</i>)	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL
10^4	20%	10%	0%	0%
10^3	20%	10%	0%	0%
10^2	40%	20%	0%	0%

	NiFe ₂ O ₄ NPs			
Bacteria (<i>P. aeruginosa</i>)	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL
10 ⁴	50%	0%	0%	0%
10 ³	50%	0%	0%	0%
10 ²	50%	10%	10%	5%


	NiO NPs			
Bacteria (<i>S. aureus</i>)	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL
10 ⁴	49%	18%	37%	54%
10 ³	19%	14%	43%	28%
10 ²	0%	0%	0%	0%

	Fe ₂ O ₃ NPs			
Bacteria (<i>S. aureus</i>)	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL
10 ⁴	45%	40%	0%	0%
10 ³	20%	100%	0%	0%
10 ²	100%	0%	0%	0%

	NiFe ₂ O ₄ NPs			
Bacteria (<i>S. aureus</i>)	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25 mg/mL	0.625 mg/mL
10 ⁴	45%	0%	0%	0%
10 ³	20%	0%	0%	0%
10 ²	0%	0%	0%	0%

En la Tabla 8, se muestra que, para *P. aeruginosa* el % de inhibición de crecimiento más alto para cada sistema de NPs, se presenta a:

- ✓ 5, 2.5, y 1.25 mg/mL de las NPs de NiO a una dilución de bacteria 10², con una inhibición de crecimiento del 100%.
- ✓ 5 mg/mL de las NPs de Fe₂O₃ a una dilución de bacteria 10², con una inhibición de crecimiento del 40%.
- ✓ 5 mg/mL de las NPs de NiFe₂O₄ a una dilución de bacteria 10⁴, 10³, y 10², con una inhibición de crecimiento del 50%.



Por otro lado, para *S. aureus* el % de inhibición de crecimiento más alto para cada sistema de NPs, se presenta a:

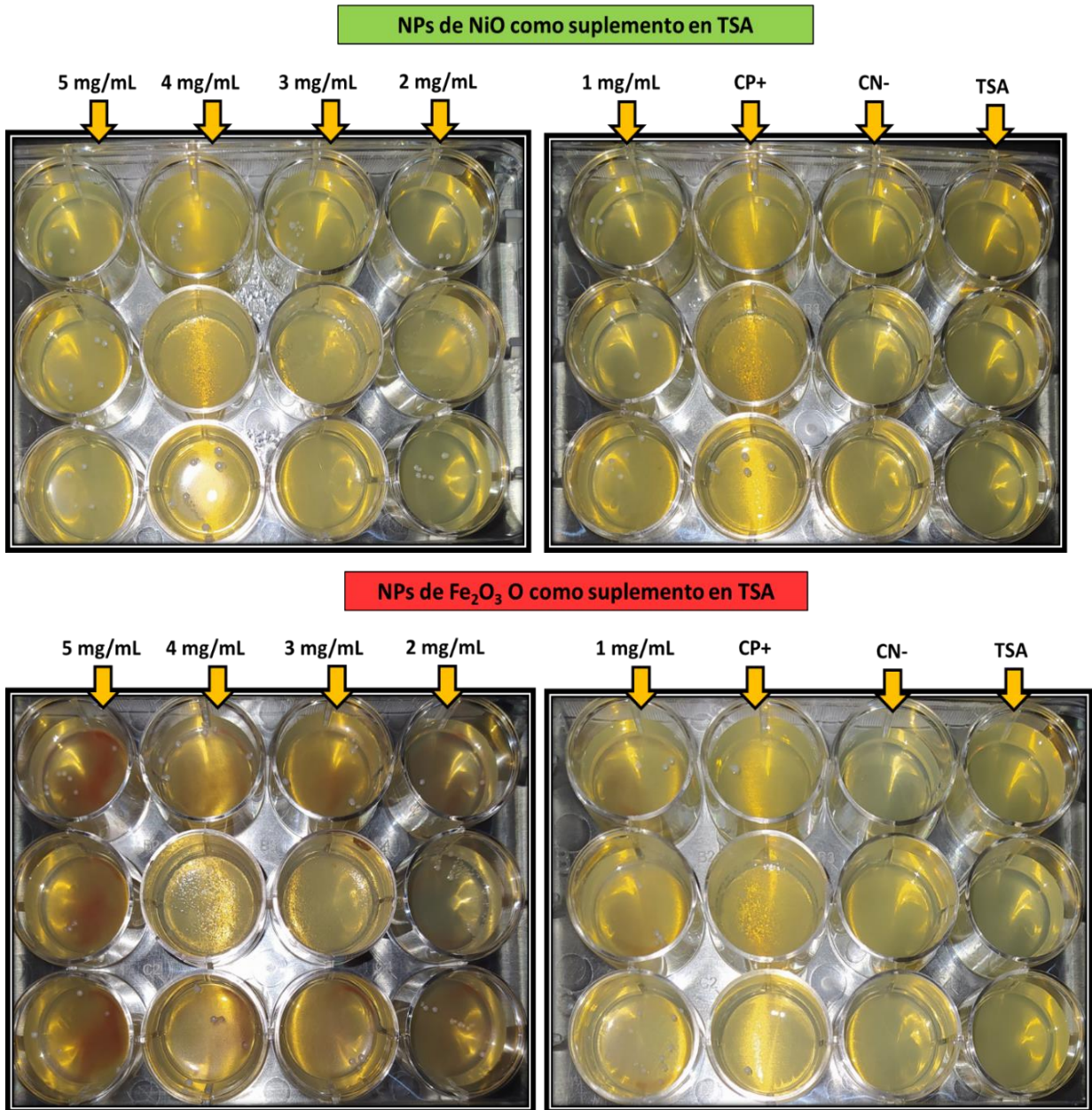
- ✓ 5 mg/mL de las NPs de NiO a una dilución de bacteria 10^4 , con una inhibición de crecimiento del 49%.
- ✓ 5 mg/mL y 2.5 mg/mL de las NPs de Fe_2O_3 a una dilución de bacteria 10^2 y 10^3 , respectivamente, con una inhibición de crecimiento del 100%.
- ✓ 5 mg/mL de las NPs de $NiFe_2O_4$ a una dilución de bacteria 10^4 con una inhibición de crecimiento del 45%.

En términos generales comparando los sistemas de NPs entre sí, se observa que las NPs de NiO tienden a presentar los mayores % de inhibición bacteriana en el experimento de susceptibilidad bacteriana en agar, seguido de la Fe_2O_3 , y la $NiFe_2O_4$. Lo anterior, puede atribuirse a la facilidad de liberación paulatina de iones de acuerdo a la estructura de los óxidos metálicos, a pesar de que la $NiFe_2O_4$ está compuesta por dos óxidos, su estructura tipo espinela inversa, lo hace un sistema más estable, dificultando la liberación paulatina de iones en el medio, por lo tanto, no presenta un efecto sinérgico como hubiéramos esperado debido a su composición química. Sin embargo, se puede sugerir que la interacción de las NPs de $NiFe_2O_4$ con la membrana bacteriana causa daños permitiendo tener porcentajes de inhibición del crecimiento significativos a pesar de su estabilidad estructural. La dilución de bacteria 10^2 y 10^3 muestra una mayor facilidad de conteo de UFC's, para *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente, por lo tanto, en el siguiente experimento se emplearán dichas diluciones de acuerdo a cada bacteria por su practicidad.

- *Ensayo 3.)* Prueba de susceptibilidad bacteriana en TSA con suplemento de las NPs.

Los resultados obtenidos en este experimento fueron evaluados a partir del conteo de las UFC's para cada pozo de la placa, sin embargo, para *P. aeruginosa* las UFC's fueron incontables, y el % de pozo en el cual no había crecimiento bacteriano no se

pudo determinar, debido a la viscosidad de la capa tipo “película” formada (Ver anexo 1). La Figura 39 muestra las fotografías de la placa de *S. aureus* después de 3 días de interacción de las NPs-bacteria, donde se observan las UFC's correspondientes a cada pozo.



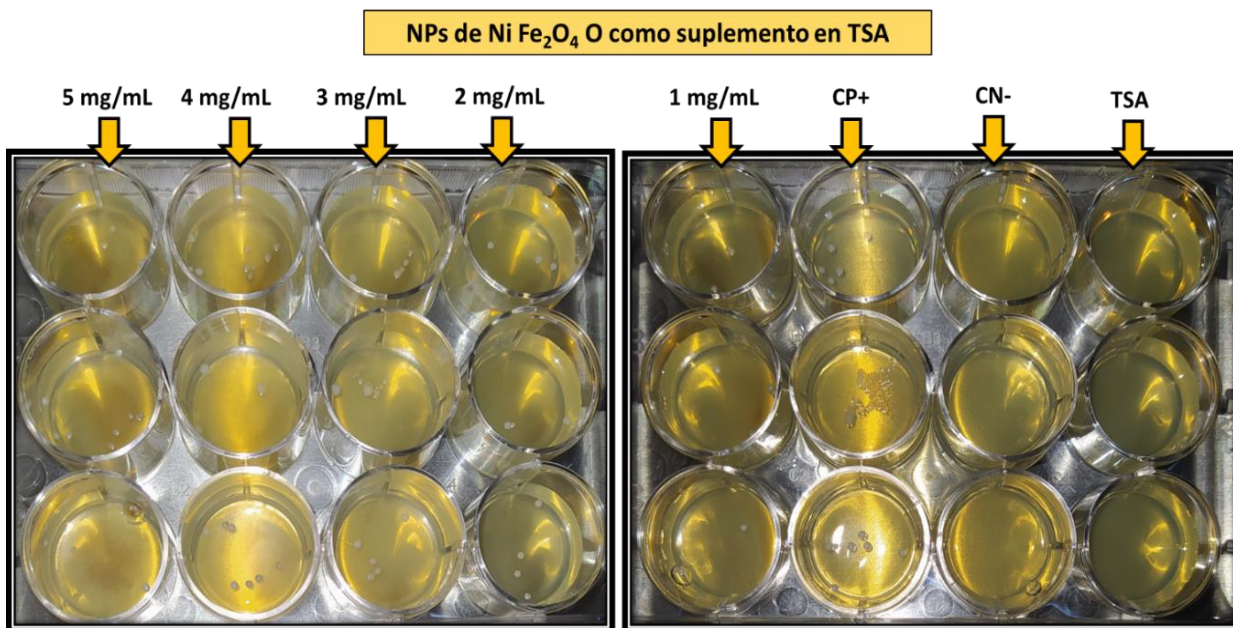



Figura 39. Fotografía de las placas de 12 pozos en TSA con suplemento de NPs, tomadas después de 3 días de la interacción NPs-*S. aureus*. Los pozos se presentan en la misma disposición que se distribuyeron en la Figura 14.

Con lo anterior y teniendo en cuenta los CP+ de bacteria, se calculó el % de inhibición de crecimiento para cada sistema de NPs y sus respectivas concentraciones, para este caso los tres pozos se promedian para obtener el % final, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición de crecimiento para cada uno de los sistemas de NPs a sus respectivas concentraciones para *S. aureus* en TSA con NPs como suplemento

NiO NPs	5 mg/mL	4 mg/mL	3 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL
<i>S. aureus</i>	88%	75%	76%	90%	94%
Fe₂O₃ NPs	5 mg/mL	4 mg/mL	3 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL
<i>S. aureus</i>	80%	77%	85%	69%	69%
NiFe₂O₄ NPs	5 mg/mL	4 mg/mL	3 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL
<i>S. aureus</i>	85%	79%	82%	85%	85%



En la Tabla 9 se muestra que para *S. aureus* el % de inhibición de crecimiento presenta una tendencia muy similar a todas las concentraciones evaluadas; valores promedio alrededor del 85 % de inhibición para las NPs de NiO, 76% para las NPs de Fe₂O₃ y de 83% para las NPs de NiFe₂O₄.

Para el caso de *P. aeruginosa*, con el crecimiento tipo “película” en los pozos de la placa, no fue posible obtener datos cuantitativos de alguna inhibición de crecimiento bacteriano. Sin embargo, se sugiere que la formación de este crecimiento tipo “película” se puede dar cuando la bacteria se expone a agentes externos que puedan afectar su crecimiento [61].

Cabe señalar que de acuerdo a los % obtenidos en el experimento de las NPs en TSA (Tabla 8) comparado con el experimento de suplemento de NPs (Tabla 9), se observa un mejor efecto microbicida de las NPs como suplemento sobre *S. aureus*, lo que indica que a mayor contacto de las NPs con la bacteria, mejor efectividad antimicrobiana, lo cual puede sugerir un mecanismo de acción por daño a la membrana mediado por la liberación paulatina de iones. Teniendo en cuenta estos posibles mecanismos, la acción antimicrobiana de las NPs frente a *P. aeruginosa* se observa menos eficiente, lo cual puede ser consecuencia de la barrera de doble membrana (una externa y la otra citoplasmática) característica de las bacterias Gram negativas. Por lo tanto, se puede concluir que, bajo las condiciones experimentales de este trabajo, las NPs evaluadas poseen mayor efecto antimicrobiano frente a la cepa de *S. aureus*, siendo esta una cepa Gram positiva, que frente a una cepa Gram negativa como es *P. aeruginosa*.


Por otro lado, a pesar de las diferencias químicas y estructurales entre los óxidos metálicos bajo estudio, en el experimento en el que se emplean las NPs como suplemento, no se aprecia una diferencia significativa entre los tres sistemas, lo que puede atribuirse al gran contacto que tienen las NPs con la bacteria (*S.aureus*) generando que la inhibición bacteriana se lleve a cabo a través del daño a la membrana bacteriana y por la liberación paulatina de iones, independientemente de su composición química.


9. CONCLUSIONES


- ✓ Se obtuvieron NPs de NiO, α -Fe₂O₃, y NiFe₂O₄ como fases únicas y con tamaños de cristalito promedio de 7 ± 1 nm, 22 ± 10 nm y 5 ± 1 nm, respectivamente, empleando el método mecanoquímico.
- ✓ Las técnicas espectroscópicas y de microscopía empleadas en la caracterización de las nanopartículas, corroboraron la formación de las NPs y la pureza de la fase obtenida para cada sistema.
- ✓ La respuesta de susceptibilidad bacteriana en caldo TSB de *S. aureus* y *P. aeruginosa* mostró un efecto antimicrobiano significativo. Sin embargo, la respuesta óptica observada a $\lambda = 595$ nm puede verse afectada por la absorción de las NPs, y no observar claramente el efecto para ambas cepas.
- ✓ El efecto antimicrobiano de las NPs de NiO, α -Fe₂O₃, y NiFe₂O₄ evaluado en el experimento de susceptibilidad bacteriana en TSA con NPs como suplemento, fue significativo para *S. aureus*, mientras que no se pudo observar un efecto sobre *P. aeruginosa*, debido a la dificultad de contar las UFC's por la formación de una "película" en el pozo.
- ✓ Las NPs de NiO tienden a presentar los mayores % de inhibición bacteriana para *P. aeruginosa*, seguido del Fe₂O₃, y la NiFe₂O₄, lo cual puede atribuirse a la facilidad de liberación paulatina de iones, de acuerdo a la estructura de los óxidos metálicos.
- ✓ El efecto antimicrobiano de las NPs de NiO, α -Fe₂O₃, y NiFe₂O₄ es más efectivo para una cepa Gram positiva como es *S. aureus*.
- ✓ Se sugiere, de acuerdo a lo informado en la literatura para los sistemas estudiados, que el efecto antimicrobiano observado, se lleva a cabo por dos mecanismos: el daño a la membrana bacteriana y la liberación paulatina de cationes en el medio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Raghunath, A. and E. Perumal, *Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2017. **49**(2): p. 137-152.
2. Vázquez-Olmos, A., A. Vega-Jiménez., and B. ; Paz-Díaz *Mecanosíntesis y efecto antimicrobiano de óxidos metálicos nanoestructurados*. Mundo Nano, 2018. **11**, p. 29-44.
3. Chandoul, F., et al., *Investigation of the properties of nanostructured nickel oxide NiO thin films irradiated at different γ -doses*. Journal of Materials Science: Materials in Electronics, 2019. **30**(1): p. 348-358.
4. Park, J., et al., *Monodisperse Nanoparticles of Ni and NiO: Synthesis, Characterization, Self-Assembled Superlattices, and Catalytic Applications in the Suzuki Coupling Reaction*. Advanced Materials, 2005. **17**(4): p. 429-434.
5. Atiq, S., et al., *Magnetic Phase Transition in Nickel Oxide*. Materials Today: Proceedings, 2015. **2**(10, Part B): p. 5262-5267.
6. Lee, I.S., et al., *Ni/NiO Core/Shell Nanoparticles for Selective Binding and Magnetic Separation of Histidine-Tagged Proteins*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(33): p. 10658-10659.
7. Rakshit, S., et al., *Controlled synthesis of spin glass nickel oxide nanoparticles and evaluation of their potential antimicrobial activity: A cost effective and eco friendly approach*. RSC Advances, 2013. **3**: p. 19348.
8. Zorkipli, N.N.M., N.H.M. Kaus, and A.A. Mohamad, *Synthesis of NiO Nanoparticles through Sol-gel Method*. Procedia Chemistry, 2016. **19**: p. 626-631.
9. Rahdar, A., M. Aliahmad, and Y. Azizi, *NiO Nanoparticles: Synthesis and Characterization*. Journal of Nanostructures, 2015. **5**(2): p. 145-151.
10. Li, X., et al., *Synthesis and characteristics of NiO nanoparticles by thermal decomposition of nickel dimethylglyoximate rods*. Solid State Communications, 2006. **137**(11): p. 581-584.
11. Zhao, Y., et al., *Synthesis of NiO nanostructures and their catalytic activity in the thermal decomposition of ammonium perchlorate*. CrystEngComm, 2016. **18**(25): p. 4836-4843.
12. Hashem, M., et al., *Fabrication and characterization of semiconductor nickel oxide (NiO) nanoparticles manufactured using a facile thermal treatment*. Results in Physics, 2016. **6**: p. 1024-1030.
13. Gondal, M.A., T.A. Saleh, and Q.A. Drmosh, *Synthesis of nickel oxide nanoparticles using pulsed laser ablation in liquids and their optical characterization*. Applied Surface Science, 2012. **258**(18): p. 6982-6986.
14. Castaño, J.G. and C. Arroyave, *La funcionalidad de los óxidos de hierro*. Revista de Metalurgia, 1998. **34**(3): p. 274-280.
15. Morales Morales, J., *Synthesis of hematite α -Fe₂O₃ nano powders by the controlled precipitation method*. CIENCIA EN DESARROLLO, 2017. **8**.
16. Huo, L., et al., *Preparation, Structure, and Properties of Three-Dimensional Ordered α -Fe₂O₃ Nanoparticulate Film*. Chemistry of Materials, 2000. **12**(3): p. 790-794.

-
- 
17. Naz, S., et al., *Green synthesis of hematite (α -Fe₂O₃) nanoparticles using *Rhus punjabensis* extract and their biomedical prospect in pathogenic diseases and cancer*. Journal of Molecular Structure, 2019. **1185**: p. 1-7.
 18. Stankic, S., et al., *Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties*. Journal of Nanobiotechnology, 2016. **14**(1): p. 73.
 19. Bhushan, M., et al., *Antibacterial applications of α -Fe₂O₃/Co₃O₄ nanocomposites and study of their structural, optical, magnetic and cytotoxic characteristics*. Applied Nanoscience, 2018. **8**(1): p. 137-153.
 20. Cesar, I., et al., *Translucent Thin Film Fe₂O₃ Photoanodes for Efficient Water Splitting by Sunlight: Nanostructure-Directing Effect of Si-Doping*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(14): p. 4582-4583.
 21. Azam, A., et al., *Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study*. International journal of nanomedicine, 2012. **7**: p. 6003-6009.
 22. Asoufi, H.M., T.M. Al-Antary, and A.M. Awwad, *Green route for synthesis hematite (α -Fe₂O₃) nanoparticles: Toxicity effect on the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer)*. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 2018. **9**: p. 107-111.
 23. Wenqing, Q., et al., *Hydrothermal Synthesis and Characterization of Single-Crystalline* Journal of Nanomaterials, 2011. **2011**.
 24. Karami, H., *Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles by Solid State Chemical Reaction Method*. J. Clust. Sci, 2010. **21**: p. 11-20.
 25. Joshi, S.S., et al., *Role of ligands in the formation, phase stabilization, structural and magnetic properties of α -Fe₂O₃ nanoparticles*. Journal of Nanoparticle Research, 2006. **8**(5): p. 635-643.
 26. Hoyos, J.R.M., et al., *Sinterização por micro-ondas de ferrita de níquel sintetizada pelo método Pechini*. Cerâmica, 2013. **59**: p. 360-365.
 27. Bhosale, S.V., et al., *Effect of surface properties of NiFe₂O₄ nanoparticles synthesized by dc thermal plasma route on antimicrobial activity*. Applied Surface Science, 2018. **441**: p. 724-733.
 28. Nithyayini, K.N., M.N.K. Harish, and K.L. Nagashree, *Electrochemical detection of nitrite at NiFe₂O₄ nanoparticles synthesised by solvent deficient method*. Electrochimica Acta, 2019. **317**: p. 701-710.
 29. Taha, T.A., A.A. Azab, and M.A. Sebak, *Glycerol-assisted sol-gel synthesis, optical, and magnetic properties of NiFe₂O₄ nanoparticles*. Journal of Molecular Structure, 2019. **1181**: p. 14-18.
 30. Udhaya, P.A. and M. Meena, *Albumen Assisted Green Synthesis of NiFe₂O₄ Nanoparticles and Their Physico-Chemical Properties*. Materials Today: Proceedings, 2019. **9**: p. 528-534.
 31. Kombaiah, K., et al., *Catalytic studies of NiFe₂O₄ nanoparticles prepared by conventional and microwave combustion method*. Materials Chemistry and Physics, 2019. **221**: p. 11-28.
 32. Sivakumar, P., et al., *Synthesis and characterization of NiFe₂O₄ nanoparticles and nanorods*. Journal of Alloys and Compounds, 2013. **563**: p. 6-11.

-
- 
33. James, S.L., et al., *Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(1): p. 413-447.
 34. Baláž, P., et al., *Hallmarks of mechanochemistry: from nanoparticles to technology*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(18): p. 7571-7637.
 35. Baláž, P., *Mechanochemistry in Nanoscience and Minerals Engineering*. 2008. 1-413.
 36. Cortés, V.G., *INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA (2a ed.)*. 2° Edición ed. 2004: Euned.
 37. Zakaria, Z., S. Sreenivasan, and M. MOHAMAD, *Antimicrobial Activity of Piper ribesoides Root Extract Against Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Biological Sciences, 2007. **1**(3).
 38. Infeciosas, I.N.d.A.y.E. *Imagen de microscopia electrónica de barrido (SEM) coloreada digitalmente en donde se muestran bacterias Staphylococcus aureus* 2008.
 39. Mercado, P., L. Llenque, and M. Trujillo, *Sensibilidad de Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus a concentración de aceite de Citrus reticulata variedad Satsuma "mandarina"*. Revista CIENCIA Y TECNOLOGÍA, 2014. **10**(2): p. 61-71.
 40. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, c.e.n.d.i. *Imagen de microscopia electronica de barrido (SEM) de Pseudomonas aeruginosa*. 2019.
 41. Hawkey, P.M., *The growing burden of antimicrobial resistance*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008. **62**(suppl_1): p. i1-i9.
 42. Smith, K.M., Y. Bu, and H. Suga, *Induction and Inhibition of Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing by Synthetic Autoinducer Analogs*. Chemistry & Biology, 2003. **10**(1): p. 81-89.
 43. Farr, B.M., et al., *Can antibiotic-resistant nosocomial infections be controlled?* The Lancet Infectious Diseases, 2001. **1**(1): p. 38-45.
 44. Ranjith Kumar, E., et al., *Structural, dielectric and gas sensing behavior of Mn substituted spinel MFe₂O₄ (M=Zn, Cu, Ni, and Co) ferrite nanoparticles*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2016. **398**: p. 281-288.
 45. Golkhatmi, F.M., B. Bahramian, and M. Mamarabadi, *Application of surface modified nano ferrite nickel in catalytic reaction (epoxidation of alkenes) and investigation on its antibacterial and antifungal activities*. Materials Science and Engineering: C, 2017. **78**: p. 1-11.
 46. Raghupathi, K.R., R.T. Koodali, and A.C. Manna, *Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles*. Langmuir, 2011. **27**(7): p. 4020-4028.
 47. Bose, P., et al., *A facile synthesis of mesoporous NiO nanosheets and their application in CO oxidation*. Journal of Asian Ceramic Societies, 2016. **4**(1): p. 1-5.
 48. Rahdar, A. and M. Aliahmad, *NiO Nanoparticles: Synthesis and Characterization*. Journal of Nanostructures, 2015. **5**.
 49. Huheey, J.E., et al., *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*. 2006: Pearson Education.
-

-
- 
50. Davar, F., Z. Fereshteh, and M. Salavati-Niasari, *Nanoparticles Ni and NiO: Synthesis, characterization and magnetic properties*. Journal of Alloys and Compounds, 2009. **476**(1): p. 797-801.
 51. Arai, K., et al., *Three-dimensional spin orientation in antiferromagnetic domain walls of NiO studied by x-ray magnetic linear dichroism photoemission electron microscopy*. Physical Review B, 2012. **85**(10): p. 104418.
 52. Chamritski, I. and G. Burns, *Infrared- and Raman-Active Phonons of Magnetite, Maghemite, and Hematite: A Computer Simulation and Spectroscopic Study*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(11): p. 4965-4968.
 53. Mirzaei, A., et al., *Synthesis and characterization of mesoporous α -Fe₂O₃ nanoparticles and investigation of electrical properties of fabricated thick films*. Processing and Application of Ceramics, 2016. **10**: p. 209-217.
 54. Mohammadikish, M., *Hydrothermal synthesis, characterization and optical properties of ellipsoid shape α -Fe₂O₃ nanocrystals*. Ceramics International, 2014. **40**: p. 1351–1358.
 55. Teja, A.S. and P.-Y. Koh, *Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles*. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, 2009. **55**(1): p. 22-45.
 56. Ahlawat, A., et al., *Mossbauer, Raman and X-ray diffraction studies of superparamagnetic NiFe₂O₄ nanoparticles prepared by sol-gel auto-combustion method*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials - J MAGN MAGN MATER, 2011. **323**: p. 2049-2054.
 57. Vazquez-Olmos, A.A., Mohamed ; Sato-Berru, R.Y.; Pedraza-Basulto, G. K. ; Garcia-Vazquez, V.; Sainz-Vidal, A.; Perez-Bañuelos, R. , and Quiroz, A. , *Mechanosynthesis of MFe₂O₄ (M = Co, Ni, and Zn) Magnetic Nanoparticles for Pb Removal from Aqueous Solution*. Journal of Nanomaterials 2016: p. 9 pages.
 58. Asokarajan, R., A. Milton Franklin Benial, and K. Neyvasagam, *Structural, Optical And Surface Morphological Properties of Nanosized Nickel Ferrite Particles by Co-Precipitation Method*. 2013. 2013.
 59. Peng, T., et al., *Preparation of NiFe₂O₄ nanoparticles and its visible-light-driven photoactivity for hydrogen production*. Catalysis Communications, 2012. **28**: p. 116–119.
 60. Kale, A., S. Gubbala, and R.D.K. Misra, *Magnetic behavior of nanocrystalline nickel ferrite synthesized by the reverse micelle technique*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2004. **277**(3): p. 350-358.
 61. Borchering, J., et al., *Iron oxide nanoparticles induce Pseudomonas aeruginosa growth, induce biofilm formation, and inhibit antimicrobial peptide function*. Environmental science. Nano, 2014. **1**(2): p. 123-132.

ANEXOS

Anexo 1.

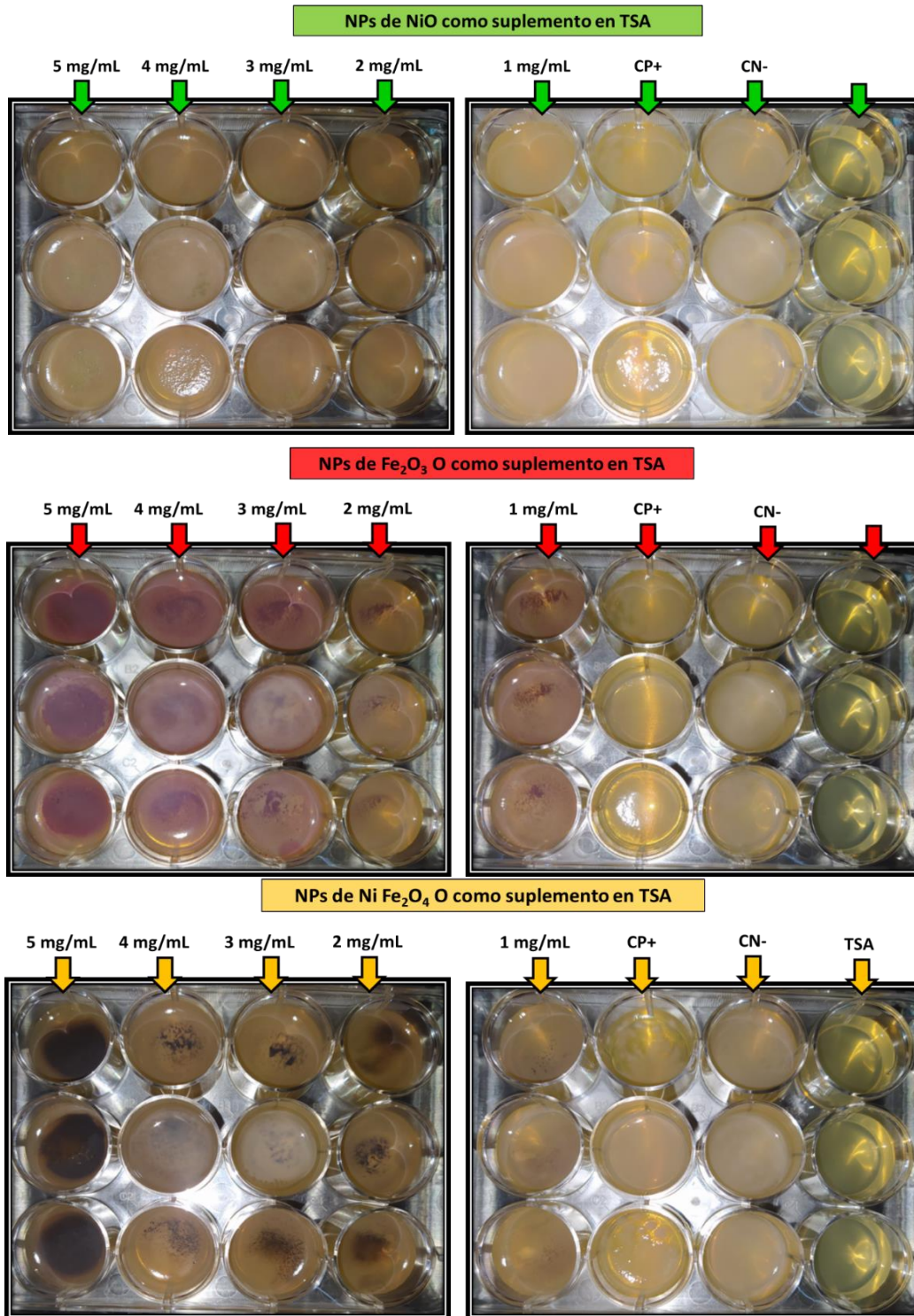


Figura A1. Fotografías de las placas de 12 pozos en TSA con NPs como suplemento tomadas después de 24h de interacción NPs-*P. aeruginosa*.